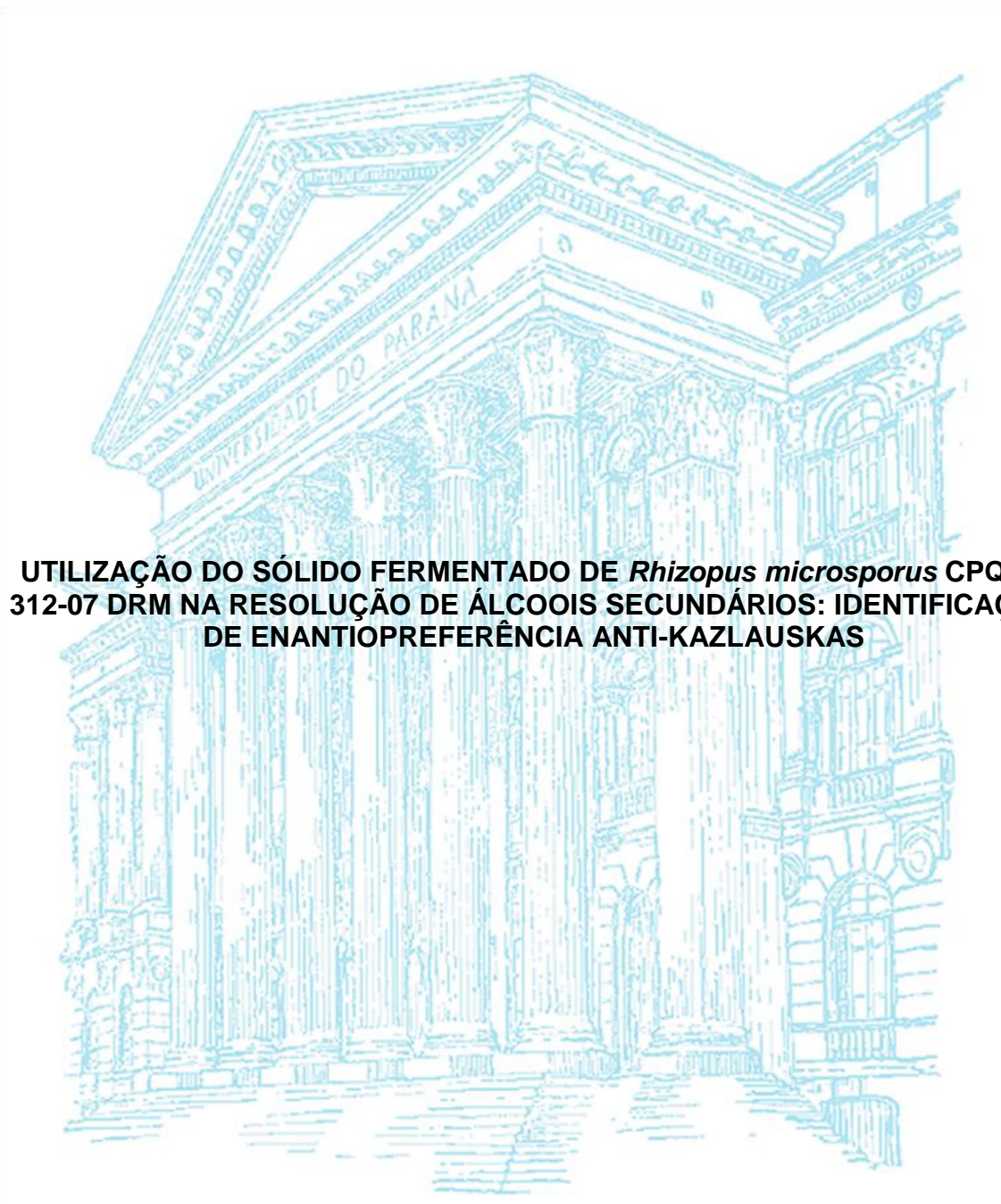


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARITZA ARAUJO TODO BOM



UTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM NA RESOLUÇÃO DE ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS: IDENTIFICAÇÃO DE ENANTIOPREFERÊNCIA ANTI-KAZLAUSKAS

**CURITIBA
2014**

MARITZA ARAUJO TODO BOM

**UTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus* CPQBA
312-07 DRM NA RESOLUÇÃO DE ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS: IDENTIFICAÇÃO
DE ENANTIOPREFERÊNCIA ANTI-KAZLAUSKAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nadia Krieger

Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Piovan

**CURITIBA
2014**

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Todo Bom, Maritza Araujo

Utilização do sólido fermentado de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM na resolução de álcoois secundários: identificação de enantiopreferência anti-Kazlauskas. / Maritza Araujo Todo Bom. – Curitiba, 2014.

102 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Nadia Krieger

Co-orientador: Leandro Piovan

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Lipase 2. Fermentação 3. Álcoois I. Título II. Krieger, Nadia III. Piovan, Leandro IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.19253

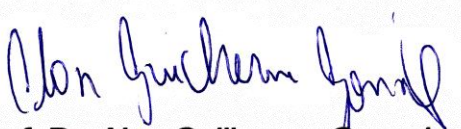
TERMO DE APROVAÇÃO


MARITZA ARAUJO TODO BOM

**UTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus*
CPQBA 312-07 DRM NA RESOLUÇÃO DE ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS:
IDENTIFICAÇÃO DE ENANTIOPREFERÊNCIA ANTI-KAZLAUSKAS**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:


Prof.^a. Dr.^a. Nadia Krieger (Orientadora)
Departamento de Química (UFPR)


Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves
Departamento de Farmácia (UFPR)


Prof. Dr. Jaime Paba Martinez
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFPR)

Curitiba, 28 de agosto de 2014

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jorge e Eliane, dentre tantas outras coisas, pelo frequente encorajamento e compreensão quanto ao meu comprometimento com a realização deste trabalho. À minha irmã Etienne, essencialmente por todo apoio e incentivo.

Ao meu companheiro, Gustavo B. Sucharski, principalmente por ter estado presente em todas as etapas do desenvolvimento do projeto, até mesmo nos mais inconvenientes horários de retiradas de alíquotas.

À Prof.^a Dr.^a Nadia Krieger, minha orientadora científica, por ter me concedido a oportunidade de progredir como pesquisadora e por todo o amadurecimento profissional e pessoal que esse período me proporcionou. Em especial, pela sua análise crítica e inúmeros ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Leandro Piovan, responsável pela coorientação deste trabalho, por ter tornado a química ainda mais interessante. Sobretudo, pelas discussões que abrangeram desde a resolução cinética enzimática até a filosofia moderna de Espinoza.

Ao Prof. Dr. David Mitchell, pelas valiosas considerações atribuídas a este trabalho, especialmente quanto ao modelo matemático utilizado para calcular os parâmetros de enantiosseletividade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Müller pela solicitude com a qual me acompanhou e contribuiu com o desenvolvimento dessa dissertação.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado avaliar este trabalho. Em especial, ao Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves pela disposição e valiosas contribuições e ao Prof Dr. Jaime Paba Martinez pelas excelentes considerações.

À Prof.^a Dr.^a Adriana Zilly, por ter me proporcionado a oportunidade de desenvolver minha iniciação científica sob sua orientação e pelo constante estímulo, além de suas excelentes sugestões literárias.

Aos alunos de Iniciação Científica, Nicoli Lourenço, Edmilson Kleinert e Rafael Preosck, por terem compartilhado comigo suas dúvidas e pela substancial colaboração na fase experimental deste trabalho. Especialmente, à futura engenheira química, Talita Fraiz, por participar ativamente do desenvolvimento do projeto com perseverança e dedicação.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) e do Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS). Em particular, à Diniara Soares, Vanderleia Botton e Aline Dutra, além da amizade, por terem me recebido gentilmente e pela serenidade com a qual me ensinaram muitos dos métodos utilizados neste trabalho. Ao Robson Carlos e ao Wellington Balmant, por terem dividido suas experiências comigo e me entusiasmado com seus conhecimentos. À Michelle Moreira e ao Glauco Diaz pelo companheirismo. À Mirian Moraes, pela torcida contínua e por ter se tornado uma grande amiga enquanto dividíamos inúmeras experiências. Ao Jonas Serres, pelas suas preciosas avaliações, que colaboraram singularmente para o aprimoramento deste trabalho e pelo seu talento no âmbito da confeitaria.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia e Enzimologia Fermentativa (LTEF), Maura Harumi, Alessandra Biz, Paulo Zilioli, Fernanda Farias e Edgar Mallmann, pelas inestimáveis contribuições.

Aos amigos do Laboratório de Síntese Química e Enzimática (LaSQuE), especialmente à Allen Carolina, pelo auxílio na interpretação dos cromatogramas e pela disposição em sanar diversas dúvidas no decorrer das análises.

As amigas do Centro de Pesquisa em Química Aplicada (CEPESQ), Débora Kochepka e Laís Dill, pelas minuciosas colaborações e pelo sempre delicioso café. Em especial, à Débora pelas inúmeras conversas, pela amizade e companheirismo incondicional.

Aos amigos do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal do Paraná, Leandro João Silva, Edson Takano, Eduardo Alberti, Eduardo Costa, Cristiano Scheuer, Rafael Nowacki, Émillyn Trevisani e Lucas Behene. Principalmente, pelos momentos de descontração e pela minha iniciação em ciência dos materiais, ao me fazerem entender que o fator de empacotamento não é tão simples quanto parece.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade. Em especial, à Prof.^a Dr.^a Sílvia Cadena, pela forma atenciosa com a qual sempre me atendeu e à secretária do departamento D. Irene pela disposição em concretizar diversas solicitações.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds the most discoveries, is not “Eureka!” (I found it!), but “That’s funny...”
Isaac Asimov

RESUMO

O sólido fermentado de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM contendo lipases tem sido utilizado no tratamento de efluentes com elevado teor de lipídios e na síntese enzimática do biodiesel. Entretanto, a enantiosseletividade das lipases imobilizadas naturalmente no sólido fermentado ainda é desconhecida e estudos utilizando sólidos fermentados na resolução cinética enzimática de compostos racêmicos são escassos. A obtenção de compostos enantiomericamente puros é considerada essencial na fabricação de diversos produtos de alto valor agregado e a resolução cinética enzimática tem se revelado mais eficiente que outros processos de separação de enantiômeros. Neste contexto, este trabalho almejou estudar a aplicação do sólido fermentado produzido por *R. microsporus* na resolução cinética de álcoois secundários. Vários parâmetros foram estudados na reação de transesterificação do (*R,S*)-1-fenil-1-etanol em frascos agitados. O progresso das reações foi avaliado através de cromatografia em fase gasosa em coluna quirál e os parâmetros de excesso enantiomérico (ee), conversão e razão enantiomérica (*E*) foram calculados. A otimização da reação levou a um aumento de cerca de oito vezes da conversão inicial e embora não tenha sido possível identificar as lipases responsáveis pela transesterificação, a enantiopreferência foi para o isômero *S* do substrato. Este comportamento também foi observado nas resoluções dos álcoois (*R,S*)-*p*-nitro-fenil-1-etanol e (*R,S*)-*p*-metoxi-fenil-1-etanol. Este comportamento é diferente do observado para a maioria das lipases, que segue a regra de Kazlauskas, ou seja, possuem enantiopreferência para o isômero *R* do substrato. Este resultado é relevante, uma vez que lipases cuja enantiopreferência seja anti-Kazlauskas são bastante incomuns. Dessa forma, a utilização do sólido fermentado contendo lipases produzidas por *Rhizopus microsporus* mostrou potencial para aplicação na resolução de álcoois secundários e a enantiopreferência anti-Kazlauskas torna interessante estudos de identificação e caracterização das lipases contidas no sólido fermentado.

Palavras-chave: lipases, fermentação em estado sólido, *Rhizopus microsporus*, álcoois secundários, resolução cinética enzimática.

ABSTRACT

The fermented solid from *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM containing lipases have been previously used in the treatment of effluents with high lipid content and in enzymatic synthesis of biodiesel. However, the enantioselectivity of the lipases naturally immobilized on the fermented solid is still unknown and studies using fermented solids in enzymatic kinetic resolution of racemic compounds are scarce. The synthesis of enantiopure compounds is considered essential in the manufacture of several products with high added value and the enzymatic kinetic resolution has proven to be more effective than others methods of separation of enantiomers. In this context, this work aimed to study the application of the fermented solid produced by *R. microsporus* in the kinetic resolution of secondary alcohols. Several parameters were studied in transesterification reactions of the (*R,S*)-1-phenyl-1-ethanol in shake flasks. The progress of the reactions was evaluated by gas chromatography on a chiral column and the parameters enantiomeric excesses (ee), conversion and the enantioselectivity ratio (*E*) were calculated. The optimization of the reaction led to an increase of about eight times of the initial conversion and, although it has not been possible to identify the lipases responsible for the transesterification, their enantiopreference was for the *S* isomer of the substrate. This behavior was also observed in the resolution of alcohols (*R,S*)-*p*-nitro-1-phenyl-ethanol and (*R,S*)-*p*-methoxyphenyl-1-ethanol. This behavior is different from that observed for the majority of lipases, which follow the Kazlauskas's rule, having an enantiopreference for the *R* isomer of the substrate. This result is relevant since lipases that have enantiopreference anti-Kazlauskas rule are quite unusual. Thus, the use of a fermented solid containing lipases produced by *Rhizopus microsporus* showed potential for the application in the resolution of secondary alcohols and the anti-Kazlauskas enantiopreference fosters studies on the identification and characterization of the lipases contained in the fermented solid.

Keywords: lipases, solid state fermentation, *Rhizopus microsporus*, secondary alcohols, enzymatic kinetic resolution.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REAÇÃO ENZIMÁTICA DE UMA LIPASE CATALISANDO A HIDRÓLISE OU A SÍNTESE DE UM TRIACILGLICEROL.....	16
FIGURA 2 – MODELO ESTRUTURAL DE α/β HIDROLASES.....	18
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO EM ESPAÇO CHEIO DA LIPASE B DE <i>Candida antarctica</i>	19
FIGURA 4 – MECANISMO DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE CATALISADA POR LIPASE	20
FIGURA 5 – REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES	21
FIGURA 6 – <i>Rhizopus sp.</i> CULTIVADO EM PLACA CONTENDO MEIO ÁGAR BATATA DEXTROSE (BDA) (A) E MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ESPORÂNGIO DE <i>Rhizopus sp.</i> (B).....	26
FIGURA 7 – SUBDIVISÃO DOS ISÔMEROS	30
FIGURA 8 – ESQUEMA DE ESTEREOISÔMEROS	31
FIGURA 9 – REGRA PARA A NOMENCLATURA DE ENANTIÔMEROS	32
FIGURA 10 – MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE COMPOSTOS ENANTIOMERICAMENTE PUROS	33
FIGURA 11 – VARIAÇÃO DE ENERGIA LIVRE (ΔG) NA RESOLUÇÃO CINÉTICA DE RACEMATOS POR ENZIMAS	35
FIGURA 12 – MODELO ESTRUTURAL DO SÍTIO ATIVO DE LIPASES SEGUNDO A REGRA DE KAZLAUSKAS <i>et al.</i> (1991).....	36
FIGURA 13 – ESTRATÉGIA DE AÇÃO	45
FIGURA 14 – REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ENTRE O ÁLCOOL 1-FENIL-1-ETANOL E ACETATO DE VINILA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO	52
FIGURA 15 – ESTRUTURA DOS DOADORES ACILA UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO	53
FIGURA 16 – ESTRUTURA DOS ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS QUIRAIS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO.....	55
FIGURA 17 – MECANISMO DE REAÇÃO DA ENZIMA SUBSTITUÍDA	57
FIGURA 18 – REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO	60
FIGURA 19 – ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DO SÓLIDO FERMENTADO ÚMIDO E LIOFILIZADO PRODUZIDO POR <i>Rhizopus microsporus</i>	63

FIGURA 20 – CINÉTICA DA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Rhizopus microsporus</i>	64
FIGURA 21 – ESTABILIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO DE <i>Rhizopus microsporus</i> AO ARMAZENAMENTO	65
FIGURA 22 – GEL DE ELETROFORESE SDS-PAGE DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO EXTRAÍDO DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Rhizopus microsporus</i>	68
FIGURA 23 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA REAÇÃO DE ACILAÇÃO DE (R,S)-1-FENIL-1-ETANOL CATALISADA PELA CALB E POR LIPASES PRESENTES NO SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO EM DIFERENTES SOLVENTES ORGÂNICOS	70
FIGURA 24 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA REAÇÃO DE ACILAÇÃO DE (R,S)-1-FENIL-1-ETANOL CATALISADA PELA CALB E POR LIPASES PRESENTES NO SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO NA PRESENÇA DE DIFERENTES DOADORES ACILA	72
FIGURA 25 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA REAÇÃO DE ACILAÇÃO DE (R,S)-1-FENIL-1-ETANOL CATALISADA PELA CALB E POR LIPASES PRESENTES NO SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE	74
FIGURA 26 – CINÉTICA DA RESOLUÇÃO DE (R,S)-1-FENIL-1-ETANOL EM DIFERENTES TEMPERATURAS UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO	76
FIGURA 27 – PORCENTAGEM RELATIVA DOS ENANTIÔMEROS R E S NA RESOLUÇÃO CINÉTICA DE (R,S)-1-FENIL-1-ETANOL EM DIFERENTES TEMPERATURAS UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO.....	77
FIGURA 28 – RESOLUÇÃO DE (R,S)-1-FENIL-1-ETANOL E PORCENTAGEM RELATIVA DOS ENANTIÔMEROS R E S.....	81
FIGURA 29 – RESOLUÇÃO DE (R,S)- <i>p</i> -NITRO-FENIL-1-ETANOL E PORCENTAGEM RELATIVA DOS ENANTIÔMEROS R E S.....	81
FIGURA 30 – APLICAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO PARA A DETERMINAÇÃO DA RAZÃO ENANTIOMÉRICA NA RESOLUÇÃO DO (R,S) 1-FENIL-1-ETANOL E (R,S)- <i>p</i> -NITRO-FENIL-1-ETANOL PELAS LIPASES PRESENTES NO SÓLIDO FERMENTADO.....	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – APLICAÇÃO DE LIPASES MICROBIANAS EM SÍNTESE ORGÂNICA	23
TABELA 2 – EFEITO DAS SOLUÇÕES EXTRATORAS NA RECUPERAÇÃO DE ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Rhizopus Microsporus</i>	66
TABELA 3 – EFEITO DA LIOFILIZAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DE ATIVIDADE DE HIDRÓLISE E DE ESTERIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO EXTRACELULAR.....	67
TABELA 4 – EFEITO DE DIFERENTES SOLVENTES ORGÂNICOS NA RESOLUÇÃO DO (R,S)-1-FENIL-1-ETANOL UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO	71
TABELA 5 – EFEITO DE DIFERENTES DOADORES ACILA NA RESOLUÇÃO DO ÁLCOOL (R,S)-1-FENIL-1-ETANOL UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO	73
TABELA 6 – EFEITO DE DIFERENTES DOADORES ACILA NA RESOLUÇÃO DO ÁLCOOL (R,S)-1-FENIL-1-ETANOL UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE	75
TABELA 7 – EFEITO DA QUANTIDADE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA NOS PARÂMETROS DE ENANTIOSSELETIVIDADE NA RESOLUÇÃO DO ÁLCOOL (R,S)-1-FENIL-1-ETANOL UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO.....	78
TABELA 8 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NOS PARÂMETROS DE ENANTIOSSELETIVIDADE NA RESOLUÇÃO DO ÁLCOOL (R,S)-1-FENIL-1-ETANOL UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO	79
TABELA 9 – EFEITO DO SUBSTRATO NOS PARÂMETROS DE ENANTIOSSELETIVIDADE NA RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO	80
TABELA 10 – REAÇÕES DE RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DE ÁLCOOIS CATALISADA POR LIPASES FÚNGICAS COM ENANTIOPREFERÊNCIA ANTI-KAZLAUSKAS.....	85

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

a_w	Atividade de água
BDA	Ágar Batata Dextrose
c	Conversão
CAL-B	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
CG	Cromatografia gasosa
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (Unicamp, Campinas, SP)
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
<i>E</i>	Razão Enantiomérica
ee	Excesso Enantiomérico
ee _p	Excesso Enantiomérico do Produto
ee _s	Excesso Enantiomérico do Substrato
FES	Fermentação em Estado Sólido
FS	Fermentação Submersa
LaSQuE	Laboratório de Síntese Química e Enzimática
LTEB	Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise
SF	Sólido Fermentado
SFL	Sólido Fermentado Liofilizado
SFU	Sólido Fermentado Úmido
SFBC	Sólido Fermentado de <i>Burkholderia cepacia</i>
TAG	Triacilglicerol
THF	Tetrahidrofurano
U	Unidades de atividade enzimática

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	LIPASES.....	16
2.1.1	Definição e características.....	16
2.1.2	Aspectos estruturais	17
2.1.3	Mecanismo catalítico	20
2.1.4	Utilização de lipases em biocatálise	21
2.2	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	24
2.2.1	Definição e aspectos gerais.....	24
2.2.2	Lipases produzidas pelo gênero <i>Rhizopus</i>	26
2.2.3	Utilização de sólido fermentado em química orgânica.....	28
2.3	RESOLUÇÃO CINÉTICA CATALISADA POR LIPASES.....	30
2.3.1	Isômeros, enantiômeros e moléculas quirais.....	30
2.3.2	Enantiosseletividade de lipases.....	35
2.3.3	Controle dos parâmetros de enantiosseletividade	38
2.3.3.1	Efeito do solvente	39
2.3.3.2	Efeito da temperatura	40
2.3.3.3	Efeito do doador acila.....	41
2.3.3.4	Efeito da concentração do substrato	41
2.3.4	Resolução cinética de álcoois secundários por lipases	42
3	OBJETIVO GERAL	44
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1	ESTRATÉGIA DE AÇÃO	45
4.2	MATERIAIS E REAGENTES	46
4.3	PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO....	46
4.3.1	Micro-organismo e preparo do inóculo	46
4.3.2	Cultivos em estado sólido.....	47
4.3.3	Preparo da solução umedecedora.....	48
4.4	CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO	48
4.4.1	Determinação da atividade de hidrólise.....	48

4.4.2	Determinação da atividade de esterificação	49
4.4.3	Estabilidade ao armazenamento	49
4.5	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO EXTRACELULAR	49
4.5.1	Extração das lipases do sólido fermentado	49
4.5.2	Determinação da atividade lipolítica	50
4.5.3	Eletroforese SDS-PAGE e zimograma	50
4.6	ENSAIOS DE ENANTIOSSELETIVIDADE	51
4.6.1	Reação de resolução cinética enzimática.....	52
4.6.2	Efeito do solvente	52
4.6.3	Efeito do doador acila	53
4.6.4	Efeito da temperatura	53
4.6.5	Efeito da quantidade de atividade enzimática	54
4.6.6	Efeito da concentração do substrato	54
4.6.7	Efeito do tipo de substrato	54
4.6.8	Determinação dos valores de excessos enantioméricos, conversão e razões enantioméricas	55
4.6.9	Determinação da razão enantiomérica (<i>E</i>) através de modelo matemático .	56
4.7	MÉTODOS ANALÍTICOS	59
4.7.1	Atividade de hidrólise.....	59
4.7.2	Atividade de esterificação.....	60
4.7.3	Método de Lowry-Tinsley.....	61
4.7.4	Determinação de proteínas	61
4.7.5	Cromatografia em fase gasosa em coluna quiral	62
4.7.6	Cromatografia em fase líquida de alta eficiência em coluna quiral.....	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO.....	63
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO EXTRACELULAR.....	66
5.2.1	Efeito das soluções na extração de lipases.....	66
5.2.2	Eletroforese SDS-PAGE e zimograma	68
5.3	ENSAIOS DE ENANTIOSSELETIVIDADE	69
5.3.1	Efeito do solvente	69
5.3.2	Efeito do doador acila	72
5.3.3	Efeito da temperatura	75
5.3.4	Efeito da quantidade de atividade enzimática adicionada ao meio reacional	77

5.3.5	Efeito da concentração do substrato	78
5.3.6	Efeito do tipo de substrato	79
6	CONCLUSÕES.....	86
7	PERSPECTIVAS	87
	REFERÊNCIAS.....	88
	ANEXO 1.....	100
	ANEXO 2.....	101
	ANEXO 3.....	102

1 INTRODUÇÃO

Lipases (E.C. 3.1.1.3) possuem como principal função a catálise da hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa. Essas enzimas são versáteis quanto a sua especificidade e seletividade, além de catalisarem diversas reações relevantes como a esterificação, transesterificação e interesterificação. Devido às suas propriedades e ao seu potencial de aplicação industrial, lipases têm atraído a atenção de pesquisadores. No entanto, a utilização de lipases em larga escala é dificultada em razão do alto custo de produção e purificação dessas enzimas (SUN; XU, 2009; YIN; LIU; TAN, 2006; KIM; YOUN; SHIN, 2006; RASSY; PERRARD; PIERRE, 2004). Inúmeros estudos têm investigado processos de obtenção de enzimas que sejam mais viáveis economicamente, e dentre eles figura a fermentação em estado sólido (FES).

A FES apresenta diversas vantagens quando comparada ao método de fermentação submersa (FS), sendo a utilização do sólido fermentado (SF) contendo atividade lipolítica por adição direta ao meio reacional uma das principais, eliminando etapas onerosas de extração e purificação (ZAGO *et al.*, 2014; RASERA *et al.*, 2012; BOTTON *et al.*, 2013; SALUM *et al.*, 2010; MARTINEZ-RUIZ *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2007). Para essa técnica, fungos filamentosos têm sido considerados organismos de escolha e, dentre eles, o gênero *Rhizopus* tem se destacado como produtor de lipases com diferentes características quanto à atividade lipolítica (DIAZ *et al.*, 2006; COUTO; SANROMÁN, 2005; DIYOROV *et al.*, 1994).

Devido à enantiosseletividade apresentada pelas lipases, elas têm sido consideradas atrativas para a resolução cinética de racematos, cujos enantiômeros são utilizados na fabricação de uma série de produtos farmacêuticos e agroindustriais de alto valor agregado (POGORI; XU; CHEIKHYOUSSEF, 2007). A resolução cinética enzimática é definida como um processo de obtenção de um composto enantiomericamente puro através da diferenciação entre dois enantiômeros de uma mistura racêmica. Nesse processo, um dos enantiômeros é convertido mais rapidamente no produto do que o outro. Dessa forma, devido à elevada enantiosseletividade exibida por algumas enzimas, como as lipases, a

resolução cinética enzimática tem sido considerada mais eficiente do que outros processos de separação de enantiômeros (KAMAL *et al.*, 2008; FABER, 2000).

Estudos envolvendo a utilização do SF produzido por *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 têm explorado as suas atividades lipolíticas, tanto de hidrólise quanto de esterificação, mas a enantiosseletividade das enzimas presentes no SF ainda não foi determinada. Estudos de resolução cinética enzimática utilizando SF são escassos; por isso e pelo potencial apresentado pelo SF de *R. microsporus* em outros trabalhos, torna-se interessante avaliar o SF em reações de química fina. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a enantiosseletividade das lipases presentes no SF e estudar a influência de variáveis reacionais nos parâmetros de enantiosseletividade na resolução cinética de álcoois quirais secundários.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LIPASES

2.1.1 Definição e características

As lipases (E. C. 3.1.1.3) são enzimas pertencentes à classe das hidrolases, cuja principal função é catalisar a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, na interface entre lipídio e água, levando à liberação de di- ou monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol (FIGURA 1). Além disso, quando a quantidade de água no sistema é suficientemente baixa a ponto de deslocar o equilíbrio da reação, as lipases podem catalisar a reação de síntese de triacilgliceróis a partir de glicerol e ácidos graxos (RHEE *et al.*, 2005; KRIEGER *et al.*, 2004; VILLENEUVE *et al.*, 2000; JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER *et al.*, 1994).

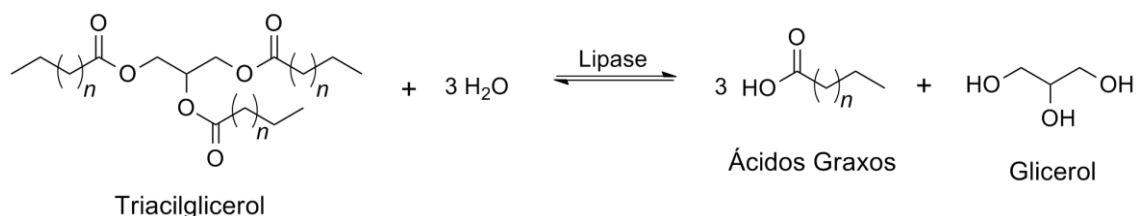


FIGURA 1 – REAÇÃO ENZIMÁTICA DE UMA LIPASE CATALISANDO A HIDRÓLISE OU A SÍNTESE DE UM TRIACILGLICEROL

Fonte: Adaptado de Jaeger *et al.* (1994).

Dessa forma, dependendo dos reagentes de partida empregados e do solvente utilizado, as reações de hidrólise e de síntese de ésteres podem ser combinadas para resultar em reações de interesterificação e transesterificação (CASTRO *et al.*, 2004; KRIEGER *et al.*, 2004).

Os substratos preferenciais das lipases são triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono), enquanto que as

esterases (carboxil-éster hidrolases, E.C. 3.1.1.1) hidrolisam ligações ésteres únicas liberando ácidos graxos de cadeia curta (até 6 átomos de carbono). Dessa forma, as lipases “verdadeiras” têm sido definidas como carboxilesterases que atuam na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, embora a maioria delas também possa hidrolisar os substratos das esterases (KAPOOR; GUPTA, 2012; JAEGER; REETZ, 1998; VERGER, 1997).

Em relação à sua interação com o substrato, lipases podem ser classificadas como quimiosseletivas, quando a enzima atua em um único grupo funcional da molécula do substrato com mais de uma funcionalidade, regiosseletivas, quando são capazes de distinguir as diferentes posições de grupos funcionais idênticos, e enantiosseletivas, quando reconhecem preferencialmente um dos isômeros de uma mistura racêmica (IFTIKHAR *et al.*, 2011; SUN; XU, 2009; CHOJNACKA; OBARA; WAWRZENCZY, 2007; JAEGER; REETZ, 1998; CHARLTON *et al.*, 1991).

Lipases são consideradas enzimas ubíquas que podem ter origem animal, vegetal ou microbiana, geralmente são extracelulares e o seu papel biológico está relacionado ao metabolismo de lipídios (WOOLLEY; PETERSEN, 1994). Com relação à estabilidade, lipases apresentam atividade em temperaturas entre 30 e 40 °C, podendo ser estáveis em temperaturas ainda maiores (60-70 °C) e constantemente apresentam atividade máxima em meio neutro (YAMANE, 1987; KILARA, 1985).

A maioria das lipases possui massa molecular entre 30 e 60 kDa; no entanto, algumas lipases podem formar agregados ou se apresentar como multímeros em solução (STUER *et al.*, 1986; VERGER, 1984; IWAI *et al.*, 1975). Lipases frequentemente apresentam características estruturais comuns, que abrangem a conformação α/β hidrolase, a presença de uma tríade catalítica e uma “tampa” hidrofóbica cobrindo o sítio ativo.

2.1.2 Aspectos estruturais

De acordo com estudos de cristalografia de raios-x, lipases de eucariotos e procariotos apresentam uma estrutura tridimensional padrão denominada conformação α/β hidrolase (BORNSCHEUER, 2002; SCHRAG; CYGLER, 1997).

Este perfil de estrutura apresenta um núcleo central composto por fitas β paralelas, rodeado por porções α -hélice (FIGURA 2) (DIJSTRA; REETZ, 1999).

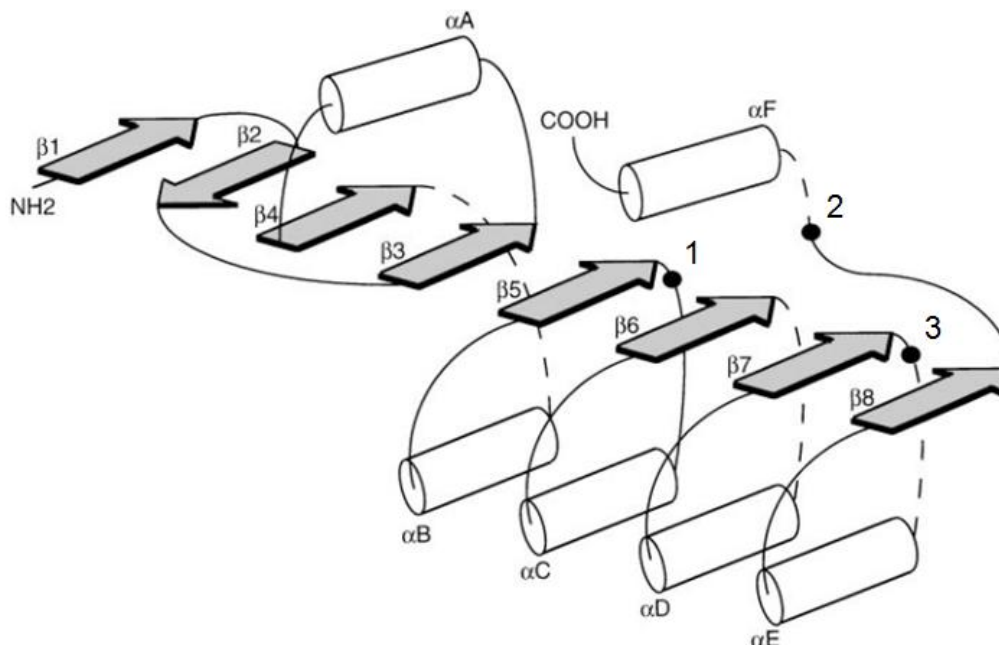


FIGURA 2 – MODELO ESTRUTURAL DE α/β HIDROLASES

As α -hélices são representadas pelos cilindros e as folhas β pelas setas planas. Os pontos preenchidos em preto representam as posições topológicas dos resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo: serina (1), histidina (2) e aspartato ou glutamato (3).

Fonte: Adaptado de Jaeger; Dijkstra; Reetz (1999).

Nas α/β hidrolases, o núcleo central é constituído por oito fitas β paralelas rodeadas por até seis α -hélices. Nesta organização, as fitas β são orientadas para a direita e o ângulo entre a primeira ($\beta 1$) e a última fita ($\beta 8$) corresponde a aproximadamente 90° (POUDEROYEN *et al.*, 2001; JAEGER; DIJSTRA; REETZ, 1999).

Outro aspecto estrutural comum a diversas lipases é a presença da tríade catalítica, um sítio catalítico (altamente conservado) formado por três resíduos de aminoácidos: serina, aspartato (ou glutamato) e histidina (JAEGER; DIJSTRA; REETZ, 1999). O resíduo de serina é ligado por ligações de hidrogênio a um resíduo de histidina, que por sua vez está ligado a um resíduo de aspartato (ou glutamato). Essa organização da tríade catalítica é muito similar à apresentada por serino-

proteases, o que levou a uma semelhança entre o mecanismo catalítico proposto para serino-proteases e lipases (item 2.1.3) (JAEGER *et al.*, 1994).

A maioria das lipases possui uma α -hélice curta que recobre o sítio catalítico chamada de “tampa hidrofóbica” ou *lid*. Essa *lid* possui cadeias laterais hidrofóbicas que, em ambientes aquosos e na ausência de substratos hidrofóbicos, sofrem um dobramento, fazendo com que a *lid* cubra o sítio catalítico. Nesta conformação, a lipase encontra-se na sua forma fechada (FIGURA 3 A) e é inativa. Na presença de substratos hidrofóbicos em solução aquosa, as lipases são “adsorvidas” na interface hidrofóbica, o que promove o deslocamento da *lid* e uma alteração na conformação da enzima deixando-a “aberta” (FIGURA 3 B) e, portanto, cataliticamente ativa.

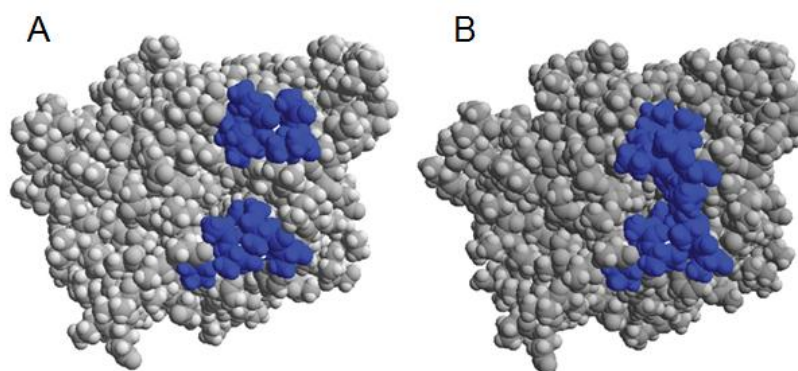


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO EM ESPAÇO CHEIO DA LIPASE B DE *Candida antarctica*

A *lid* está representada em azul em conformação aberta (A) e fechada (B).

Fonte: Ganjalikhany *et al.* (2012).

Devido a essa exposição do sítio catalítico da enzima, o acesso à tríade catalítica é favorecido; a mudança na estrutura tridimensional da lipase em interfaces água/óleo é conhecida como ativação interfacial (JAEGER; DIJSTRA; REETZ, 1999; SCHRAG *et al.*, 1997). Em 1958, Sarda e Desnuelle definiram que a ativação interfacial é uma característica exclusiva das lipases, enquanto que as esterases atuam apenas em substratos de cadeia curta, ou seja, substratos mais solúveis em água. Entretanto, algumas lipases que não apresentam ativação interfacial mesmo possuindo a *lid* foram descritas, como por exemplo, as lipases de

Pseudomonas aeruginosa e de *Burkholderia glumae* (HASAN; SHAH; HAMEED, 2009; JAEGER; DIJSTRA; REETZ, 1999).

2.1.3 Mecanismo catalítico

Conforme referido anteriormente, o arranjo tridimensional do sítio catalítico das lipases é muito similar ao das serino-proteases e, devido a essa semelhança, o mecanismo catalítico da hidrólise de triacilgliceróis por lipases segue o modelo proposto para a quimiotripsina, uma serino-protease (FIGURA 4) (JAEGER *et al.*, 1994).

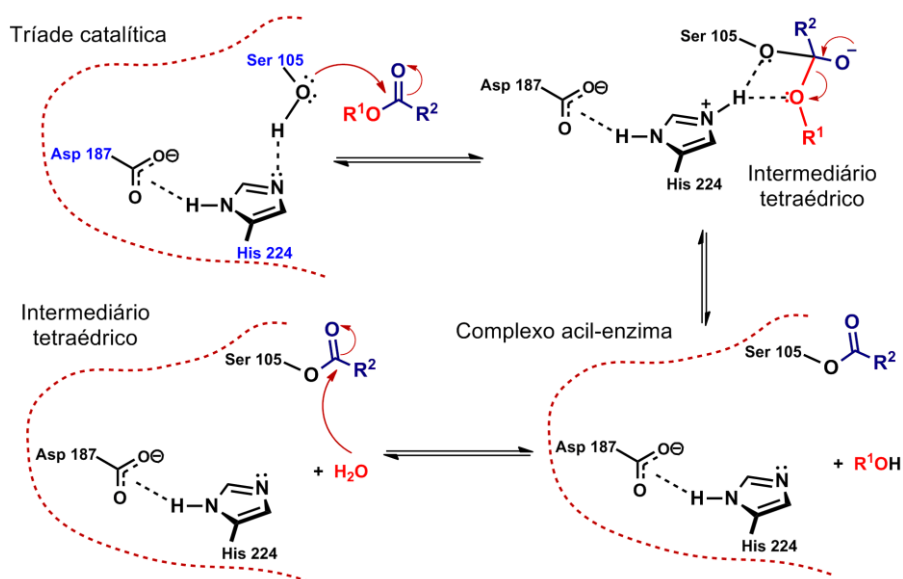


FIGURA 4 – MECANISMO DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE CATALISADA POR LIPASE

Fonte: Adaptado por Silva (2011) de Jaeger *et al.* (1994).

A reação de hidrólise ocorre em duas etapas: inicialmente a interação do resíduo negativamente carregado de aspartato (ou glutamato) permite ao resíduo de histidina agir como uma base, removendo um próton do grupo hidroxila do resíduo de serina do sítio ativo, aumentando seu caráter nucleofílico. Posteriormente, o íon alcóxido nucleofílico gerado no resíduo de serina ataca a carboxila do substrato, formando um intermediário tetraédrico, denominado oxiânion, que é estabilizado por

duas ligações de hidrogênio formadas com os grupamentos amida entre os resíduos de aminoácidos específicos. Uma molécula de álcool é liberada e o grupo acila do substrato liga-se covalentemente, formando um complexo acil-enzima. Na segunda etapa, um nucleófilo, geralmente a água, ataca o complexo acil-enzima, liberando um ácido graxo e regenerando o sítio ativo da enzima (JAEGER *et al.*, 1994).

Dependendo do meio reacional utilizado, aquoso ou orgânico, outro nucleófilo pode competir com a água pelo complexo acil-enzima conduzindo, assim, a um número significativo de reações úteis em biocatálise (FIGURA 5).

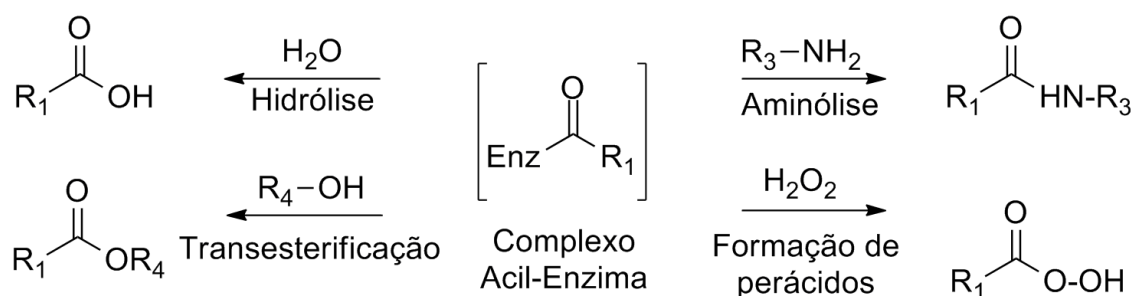


FIGURA 5 – REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES

Fonte: Adaptado de Gotor (2002).

2.1.4 Utilização de lipases em biocatálise

A biocatálise é definida como um processo em que um catalisador biológico é utilizado para converter um substrato em condições controladas; essa ferramenta sintética é considerada uma área multidisciplinar que se encontra em amplo desenvolvimento (MOORE; BORNSCHEUER, 2014; KRIEGER *et al.*, 2004; AIRES-BARROS, 2002).

Do ponto de vista termodinâmico, o biocatalisador atua como qualquer outro catalisador, reduzindo a energia de ativação necessária para a conversão química de uma substância em outra, permitindo que reações químicas ocorram a uma velocidade considerável. Além disso, os biocatalisadores não são consumidos ou alterados durante a reação; no entanto, um dos maiores problemas inerentes à biocatálise é a falta de estabilidade do biocatalisador às condições reacionais

(ILLANES, 2008). Entretanto, quando comparada com a catálise química, a biocatálise proporciona várias vantagens, como eficiência elevada, maior grau de seletividade e condições de reação ecologicamente viáveis (HUDLICKY; REED, 2009; REETZ, 2009).

Neste contexto, as hidrolases representam cerca de 80% das enzimas utilizadas em processos de biocatálise, e dentre elas as lipases se destacam por serem versáteis e bem adaptadas às condições reacionais empregadas nas indústrias, além de dispensarem o uso de cofatores (TUFVESSON *et al.*, 2011; KRISHNA, 2002).

Além da escolha do biocatalisador, a biocatálise envolve a seleção de um meio reacional, que pode ser convencional (meio aquoso) ou não convencional (meio não-aquoso). Uma vez que a água não favorece reações de síntese de ésteres e limita a produtividade de diversos processos, principalmente os que envolvem substratos hidrofóbicos, o meio convencional não é adequado para aplicações em síntese orgânica (KRIEGER *et al.*, 2004; AIRES-BARROS, 2002). Entretanto, apesar da designação de “meio não-aquoso”, um teor mínimo de água é requerido para a manutenção da estrutura ativa da enzima. Os meios não convencionais, onde o teor de água é limitado, podem ser classificados em solventes orgânicos, fluídos supercríticos, sistemas livres de solvente, nos quais apenas os substratos da reação compõem o meio reacional, líquidos iônicos e sistemas micelares (KLIBANOV, 2001).

Lipases têm sido empregadas em reações de síntese como esterificação, transesterificação e interesterificação, em diversos processos industriais, como apresentado na TABELA 1.

TABELA 1 – APLICAÇÃO DE LIPASES MICROBIANAS EM SÍNTESE ORGÂNICA

Micro-organismo	Lipase	Reação Catalisada	Produto	Indústria	Referência
<i>Candida antarctica</i> B	Imobilizada	Esterificação	Aromas	Alimentícia	Rodrigues <i>et al.</i> (2008)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Imobilizada	Transesterificação			Garlapati e Banerjee (2013)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Livre				Sun <i>et al.</i> (2012)
<i>Candida antarctica</i> B	Imobilizada	Esterificação	Surfactantes	Cosmética, Alimentícia e Farmacêutica	Cao, Bornscheuer e Schmid (1999)
<i>Mucor miehei</i>					Ward, Fang e Li (1997)
<i>Candida antarctica</i>					
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	Sólido Fermentado ¹	Esterificação	Biodiesel	Biodiesel	Soares <i>et al.</i> (2013)
	Imobilizada				Baron <i>et al.</i> (2014)
	Sólido Fermentado ¹	Transesterificação			Salum <i>et al.</i> (2010)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Sólido Fermentado	Interesterificação	Gorduras modificadas	Nutracêutica	Rasera <i>et al.</i> (2012)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Imobilizada	Transesterificação Enantiosseletiva	Compostos Enantiomericamente Puros	Farmacêutica e Química	Brem <i>et al.</i> (2012)
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11					Moure <i>et al.</i> (2013)
<i>Candida antarctica</i> B					Andrade e Barcellos (2009)
Fungos Filamentosos	Sólido Fermentado ¹				Nagy <i>et al.</i> (2006)
<i>Rhizopus</i> sp.	Liofilizada				Macedo <i>et al.</i> (2003)

¹ Sólido produzido por fermentação em estado sólido.

Dentre todas as aplicações, a obtenção de compostos enantiomericamente puros tem recebido considerável atenção. Isso se deve principalmente à enantiosseletividade apresentada por lipases, e também à contínua demanda de compostos em suas formas enantiomericamente ativas e ao alto valor agregado aos compostos opticamente puros (GONÇALVES, MARSAIOLI, 2013; CARVALHO *et al.*, 2005).

2.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

2.2.1 Definição e aspectos gerais

Existem dois tipos básicos de fermentação que possuem como intuito a produção de enzimas e outros metabólitos: fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES). Na FS, os substratos utilizados para o cultivo do micro-organismo são dissolvidos em meio líquido; já na FES, o micro-organismo é cultivado em substratos sólidos umedecidos ou suportes inertes, na ausência de água livre. Porém, apesar da baixa atividade de água (a_w) no processo de FES, o substrato possui umidade suficiente para que o micro-organismo cresça e realize seu metabolismo (MITCHELL *et al.*, 2006; RAJARD *et al.*, 2005; PANDEY, 2003).

Estudos evidenciam que a maior vantagem da FES é a matéria-prima extremamente barata utilizada como substrato principal (COUTO; SANROMÁN, 2006). Atualmente, conceitos como reciclagem, melhoramento e bioconversão de resíduos agroindustriais têm atraído atenção, devido à grande disponibilidade desses resíduos e o problema eminente da poluição do ambiente (RANI; GHOSH, 2011). Resíduos industriais, agroindustriais e orgânicos são uma significativa fonte de nutrientes que podem servir como meio de cultivo para micro-organismos que sejam capazes de produzir lipases (SALIHU *et al.*, 2012). Dessa forma, a FES se apresenta como uma tecnologia simples e autossustentável, atingindo dois diferentes propósitos: produtos de alto valor agregado e gestão de resíduos (RANI; GHOSH, 2011).

Além de proporcionar uma alternativa para o problema de descarte de resíduos sólidos, a FES possui diversas vantagens quando comparada com a FS, que incluem: maior produtividade de fermentação, menor repressão catabólica e degradação por proteases, menor demanda de água e menor contaminação (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004). As mais importantes vantagens da FES, quando comparadas às da FS, são consequência da diferente fisiologia apresentada por fungos e outros micro-organismos em um substrato sólido. Porém, os fatores moleculares e fisiológicos para este comportamento distinto não são bem definidos (BARRIOS-GONZÁLES, 2012). De acordo com Pandey (2003), a razão lógica dessas vantagens é a de que nas culturas microbianas em FES, os micro-organismos estão mais próximos do seu *habitat* natural e, provavelmente por este motivo, as atividades enzimáticas apresentadas por eles são aumentadas.

Além disso, estudos prévios mostraram que não existe necessidade de extrair a enzima do sólido fermentado (SF), pois este pode ser utilizado diretamente no meio reacional na síntese de ésteres (RASERA *et al.*, 2012; SALUM *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2007). No entanto, a FES também apresenta algumas desvantagens que, de certa forma, desmotivam sua aplicação industrial; dentre os principais fatores encontram-se variáveis difíceis de controlar em condições de disponibilidade de água limitada, como a temperatura, pH, umidade, concentração de substrato ou a aeração do meio (HÖLKER, HÖFER, LENZ, 2004).

A FES tem se sobressaído como uma tecnologia potencial para a produção de alimentos, biodiesel, produtos químicos industriais e farmacêuticos, sendo considerada promissora na obtenção de produtos de alto valor agregado, como fármacos. Neste contexto, patentes e publicações relacionadas a aspectos fundamentais da FES têm crescido e abordado o desenvolvimento de biorreatores, modelagem e a produção de diversos metabólitos microbianos primários e secundários, além de bioprocessos como o biobeneficiamento e a biorremediação (PANDEY, 2003).

2.2.2 Lipases produzidas pelo gênero *Rhizopus*

A baixa atividade de água (a_w) no substrato durante a produção de lipases por FES restringe o número de micro-organismos com aplicação viável. Desta forma, fungos como do gênero *Rhizopus* têm sido a opção preferencial para cultivos em FES, devido à sua capacidade de tolerar ambientes com baixos valores de a_w e por produzirem enzimas extras e intracelulares, que, de acordo com a cepa fúngica possuem propriedades bioquímicas únicas (JENNESSEN *et al.*, 2008; CHEIKHYOUSSEF, 2007; POGORI; XU; CHEIKHYOUSSEF, 2007; COUTO; SANROMÁN, 2005; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000). Fungos filamentosos do gênero *Rhizopus* são classificados como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) e caracterizam-se pela presença de hifas e formação de micélio (FIGURA 6) (JENNESSEN *et al.*, 2008; RAIMBAULT; TORO, 1997).

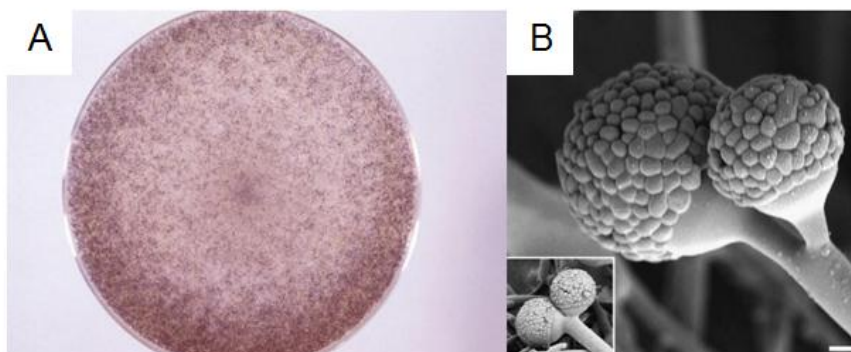


FIGURA 6 – *Rhizopus* sp. CULTIVADO EM PLACA CONTENDO MEIO ÁGAR BATATA DEXTROSE (BDA) (A) E MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ESPORÂNGIO DE *Rhizopus* sp. (B)

Fonte: Jennessen *et al.* (2008).

A aplicação das lipases produzidas por fungos abrange a produção de fármacos, cosméticos e biodiesel, cuja demanda mundial vem crescendo mediante a atenção voltada ao uso de energia renovável (SALIHU *et al.*, 2012; POGORI; XU; CHEIKHYOUSSEF, 2007). Além disso, como lipases de *Rhizopus* são 1,3-específicas, ou seja, hidrolisam as ligações éster dos triglicerídeos na posição *sn*-1 e

sn-3, mas não na posição *sn*-2, e podem ser aplicadas na modificação de óleos e gorduras na indústria de alimentos, onde esta característica é desejável (KITPREECHAVANICH *et al.*, 2008; POGORI; XU; CHEIKHYOUSSEF, 2007).

Por apresentarem enantiosseletividade, lipases de *Rhizopus* também têm sido consideradas atrativas para a resolução de racematos aplicados como precursores para a síntese de uma variedade de produtos farmacêuticos (POGORI; XU; CHEIKHYOUSSEF, 2007).

A cepa *R. microsporus* CPQBA 312-07 DRM, utilizada neste trabalho, foi isolada no México e cedida pelo Professor Jesus Cordova (Universidade de Guadalajara, México), e tem sido utilizada para a produção de lipases por FES com vistas ao estudo de algumas aplicações no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) da UFPR. Inicialmente, as condições de cultivo e a aplicação do SF para tratamento de efluentes com elevado teor de lipídios foram otimizadas por Alberton *et al.* (2010). Neste estudo, foram utilizados substratos compostos por uma mistura de bagaço de cana e farelo de semente de girassol, obtendo-se uma atividade lipolítica máxima de cerca de 80 U g⁻¹SS (unidades por grama de sólido seco) e concluiu-se que o SF contendo células e as lipases extracelulares foi capaz de degradar eficientemente as gorduras contidas no efluente, favorecendo uma redução dos parâmetros DQO e DBO (demanda química e bioquímica de oxigênio, respectivamente). Na continuação dos estudos de tratamento de efluentes com o SF, Zawadzki *et al.* (2013) otimizaram a pré-hidrólise enzimática de efluentes de laticínios em biorreator de fluxo contínuo. Em ambos os casos, verificou-se que o SF produzido por *R. microsporus* era eficiente no tratamento de efluentes com elevado teor lipídico.

Em outros estudos usando o SF com atividade lipolítica (cerca de 80 U g⁻¹SS) produzido por *R. microsporus*, Zago (2010) otimizou a síntese enzimática de biodiesel em presença de solventes e Rasera *et al.* (2012) demonstraram que era possível catalisar modificações de gorduras por transesterificação (acidólise) e por interesterificação utilizando o mesmo SF. Mais recentemente, Zago *et al.* (2014) produziram o SF (91 g⁻¹SS) utilizando uma mistura de bagaço de cana e semente de girassol, com o objetivo de sintetizar ésteres etílicos para produção de biodiesel.

Em todos os trabalhos citados acima, a atividade lipolítica do SF foi utilizada tanto em reações de hidrólise quanto de síntese, mas a enantiosseletividade das lipases contidas no SF não foi avaliada.

2.2.3 Utilização de sólido fermentado em química orgânica

Em 2006, Nagy *et al.* realizaram o primeiro estudo de aplicação direta de sólidos fermentados com atividade lipolítica em reações de resolução cinética enzimática em meio orgânico. Os pesquisadores avaliaram a enantiosseletividade das lipases contidas nos sólidos fermentados produzidos por trinta e oito fungos filamentosos em reações de resolução de alcoóis secundários racêmicos.

Posteriormente, Fernandes *et al.* (2007) utilizaram sólido fermentado de *B. cepacia* LTEB (SFBC) liofilizado em reações de esterificação e transesterificação em frascos agitados. Nas reações de esterificação, foram obtidos 94% de conversão em 18 h em meio reacional contendo 555 mg de SFBC, 350 mmol L⁻¹ de etanol e 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico (razão molar 5:1) em 5 mL de *n*-heptano. Nos primeiros ensaios de transesterificação, foram obtidos 95% de conversão em 120 h em meio reacional contendo 630 mg de SFBC, 420 mmol L⁻¹ de etanol e 70 mmol L⁻¹ de óleo de milho (razão molar 6:1) em 5 mL de *n*-heptano, a 37 °C e 200 rpm. Dando sequência a esse trabalho, Salum *et al.* (2010) otimizaram a produção de SFBC, produzindo um SF com o dobro da atividade anterior, que foi aplicado em reações de transesterificação em sistema livre de solvente (SLS). Neste estudo, foram obtidos 95% de conversão em 46 h de reação em reator de leito fixo preenchido com 3 g de SFBC e meio reacional contendo 72 mmol L⁻¹ de etanol e 24 mmol L⁻¹ de óleo de soja (razão molar 3:1) com vazão de recirculação de 1,5 mL min⁻¹, a 50 °C.

Mais recentemente, estudos têm aplicado sólidos fermentados de *Burkholderia cenocepacia* em reações de etanolise do óleo de soja para produção de biodiesel (LIU *et al.*, 2013; 2014). Em 2013, Liu *et al.* aplicaram o sólido fermentado em reações de transesterificação em meio reacional contendo 1,5 g de sólido fermentado por mL de meio, 2,8 g de etanol e 13 g de óleo de soja (razão molar 4:1) em *tert*-butanol (20%, m m⁻¹). Neste estudo, foram obtidos 86% de conversão em 96 h de reação em frascos agitados a 200 rpm, a 45 °C. Em outra abordagem, Liu *et al.* (2014) desenvolveram um modelo cinético baseado no mecanismo Ping Pong Bi Bi com inibição competitiva pelo etanol, que foi satisfatoriamente ajustado aos resultados experimentais.

Além disso, sólidos fermentados produzidos por fungos do gênero *Rhizopus* sp. também têm sido utilizados diretamente em reações de esterificação e

transesterificação (ZAGO *et al.*, 2014; BOTTON *et al.*, 2013; MARTINEZ-RUIZ *et al.*, 2008). Em 2008, nas reações utilizadas por Martinez-Ruiz *et al.* foi possível obter 100% de conversão em 60 min, em meio reacional contendo 1 g de sólido fermentado, 250 mmol L⁻¹ de etanol e 50 mmol L⁻¹ de ácido oleico (razão molar 5:1) em 9 mL de *n*-hexano, a 45 °C. Zago (2010) aplicou o sólido fermentado de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07(SFRM) em reações de esterificação em frascos agitados, foram obtidos 98% de conversão em 3 h em meio reacional contendo 2,2 g de SFRM, 210 mmol L⁻¹ de etanol e 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico (razão molar 3:1) em 15 mL de *n*-heptano, a 30 °C e 180 rpm. Em reações de transesterificação em reator de leito fixo contendo 3 g de SFRM, foram obtidos apenas 57% de conversão em 120 h, em meio reacional contendo 210 mmol L⁻¹ de etanol e 70 mmol L⁻¹ de óleo de milho (razão molar 3:1) em 50 mL de *n*-heptano, com vazão de recirculação de 2 mL min⁻¹, a 44 °C. Mais recentemente, Zago *et al.* (2014) obtiveram 91% de conversão em reações de transesterificação em frascos agitados em 48 h, a 44 °C em meio reacional contendo 210 mmol L⁻¹ de etanol e 70 mmol L⁻¹ de óleo de milho (razão molar 3:1) em *n*-heptano e 1,32 g de SFRM em 15 mL de meio.

Nos estudos acima, SFBC proporcionou maiores rendimentos em reações de transesterificação em SLC do que SFRM. Entretanto, Zago (2010) não realizou a otimização das reações com SFRM. Recentemente, Botton *et al.* (2013) produziram um novo SFRM com maior atividade (300 U g⁻¹SS), que está sendo utilizado na síntese de oleato de etila em SLS. Nestas reações, já foram obtidos 98% de conversão em 48 h em meio reacional contendo 1,6 g de SFRM, 300 mmol de etanol e 30 mmol de ácido oleico (razão molar 10:1), a 40 °C e 200 rpm.

É interessante evidenciar que a utilização de sólidos fermentados diretamente no meio reacional evita a necessidade de etapas adicionais de extração e imobilização da enzima e, portanto, tem potencial para reduzir o custo envolvido na síntese enzimática de compostos de interesse industrial.

2.3 RESOLUÇÃO CINÉTICA CATALISADA POR LIPASES

2.3.1 Isômeros, enantiômeros e moléculas quirais

Isômeros são definidos como compostos diferentes entre si, mas que possuem a mesma fórmula molecular e podem ser constitucionais ou estereoisômeros. Os isômeros constitucionais diferem quanto à ordem com a qual seus átomos estão conectados e os estereoisômeros diferem apenas no arranjo espacial de suas moléculas (FIGURA 7) (SOLOMONS; FRYHLE, 2008).

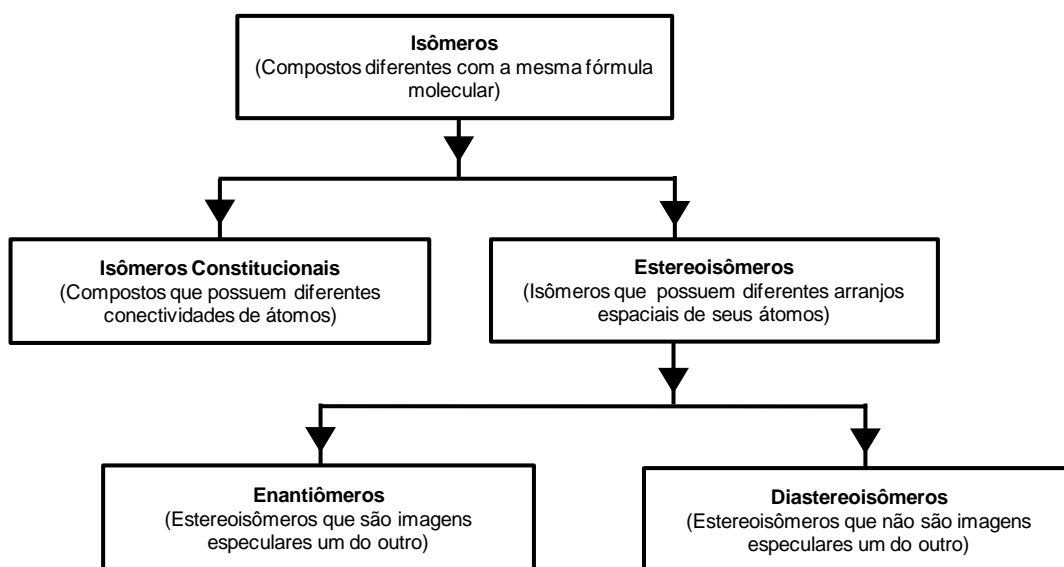


FIGURA 7 – SUBDIVISÃO DOS ISÔMEROS

Fonte: Adaptado de Solomons e Fryhle (2008).

Os estereoisômeros são subdivididos em duas categorias gerais: enantiômeros e diastereômeros. Enantiômeros são estereoisômeros cujas moléculas são imagens especulares uma da outra e que não se sobrepõem, e diastereômeros são estereoisômeros cujas moléculas não são imagens especulares uma da outra (FIGURA7) (SOLOMONS; FRYHLE, 2008).

Moléculas quirais, que podem ser compostas por enantiômeros, apresentam em suas estruturas um centro assimétrico, que geralmente é um carbono tetraédrico, no qual estão ligados quatro grupos substituintes diferentes, chamado de carbono assimétrico (FIGURA 8) (SOLOMONS; FRYHLE, 2008).

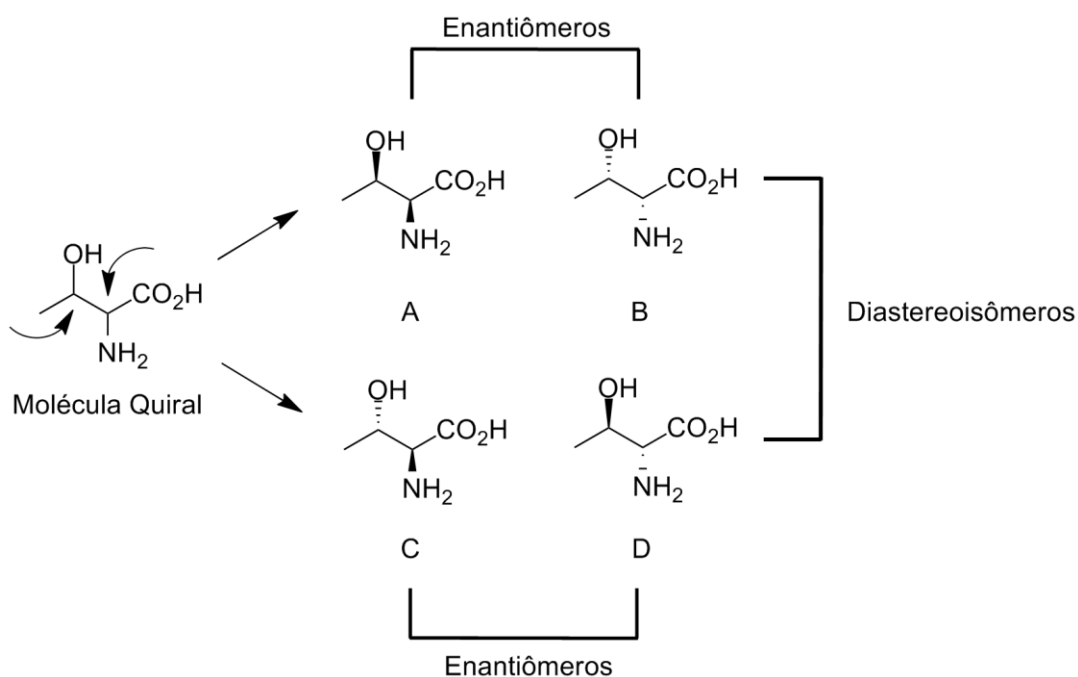


FIGURA 8 – ESQUEMA DE ESTEREOISÔMEROS

Onde: A e B, C e D são enantiômeros; A e C, B e D, A e D, C e B são diastereoisômeros. As flechas curvas apontam para os carbonos assimétricos.

Fonte: Adaptado de Carey e Sundberg (2007).

Os enantiômeros recebem os prefixos *R* ou *S* (*Rectus* e *Sinister*, respectivamente) de acordo com o sistema proposto em 1966 pelos químicos Cahn, Ingold e Prelog. A nomenclatura se baseia na prioridade dos números atômicos dos grupos substituintes ligados ao centro assimétrico do composto quiral, de acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC). Para aplicação da regra, o grupo de menor prioridade da molécula deve estar orientado para trás enquanto a prioridade dos outros grupos é enumerada (FIGURA 9).

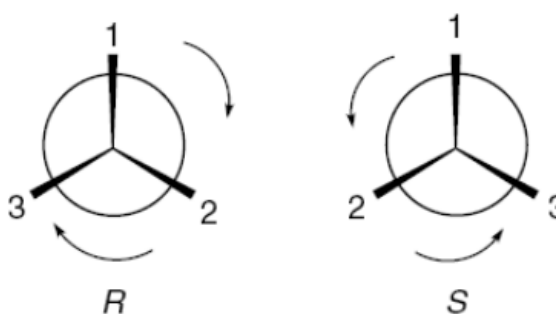


FIGURA 9 – REGRA PARA A NOMENCLATURA DE ENANTIÔMEROS

Aplicação da regra de Cahn, Ingold e Prelog (1966), onde: 1, 2 e 3 representam os grupos substituintes e, *R* e *S* as configurações dos enantiômeros.

Fonte: Carey e Sundberg (2007).

Enantiômeros possuem propriedades químicas e físicas idênticas, exceto quanto à rotação específica da luz polarizada. No entanto, devido ao desigual arranjo molecular no espaço, estes isômeros podem apresentar propriedades distintas quando utilizados em processos onde existem um receptor ou um reagente quiral. Essa particularidade é especialmente importante no setor farmacêutico, devido aos efeitos biológicos e possíveis efeitos nocivos provocados pelos enantiômeros de um composto quiral (CAREY; SUNDBERG, 2007; CAREY, 1992).

O crescente interesse pela obtenção de compostos enantiomericamente puros pode ser observado através do número cada vez maior de trabalhos publicados relacionados à investigação de parâmetros de enantiosseletividade enzimática, estudos de síntese assimétrica, desenvolvimento de métodos analíticos e à farmacologia (REETZ, 2013; WANG *et al.*, 2012; ILLANES *et al.*, 2012).

2.3.2 Obtenção de compostos enantiomericamente puros

Os métodos utilizados para obtenção de compostos enantiomericamente puros podem ser divididos de acordo com o material de partida, que pode ser um composto quiral, um substrato pró-quiral ou uma mistura racêmica (FIGURA 10). O composto quiral refere-se a um produto isolado, que geralmente está disponível

apenas na forma de um dos enantiômeros. Estes compostos podem ser convertidos em outros compostos através de síntese química, para posterior aplicação como blocos de construção para formação de uma molécula de interesse (GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2004; JAEGER; REETZ, 1998).

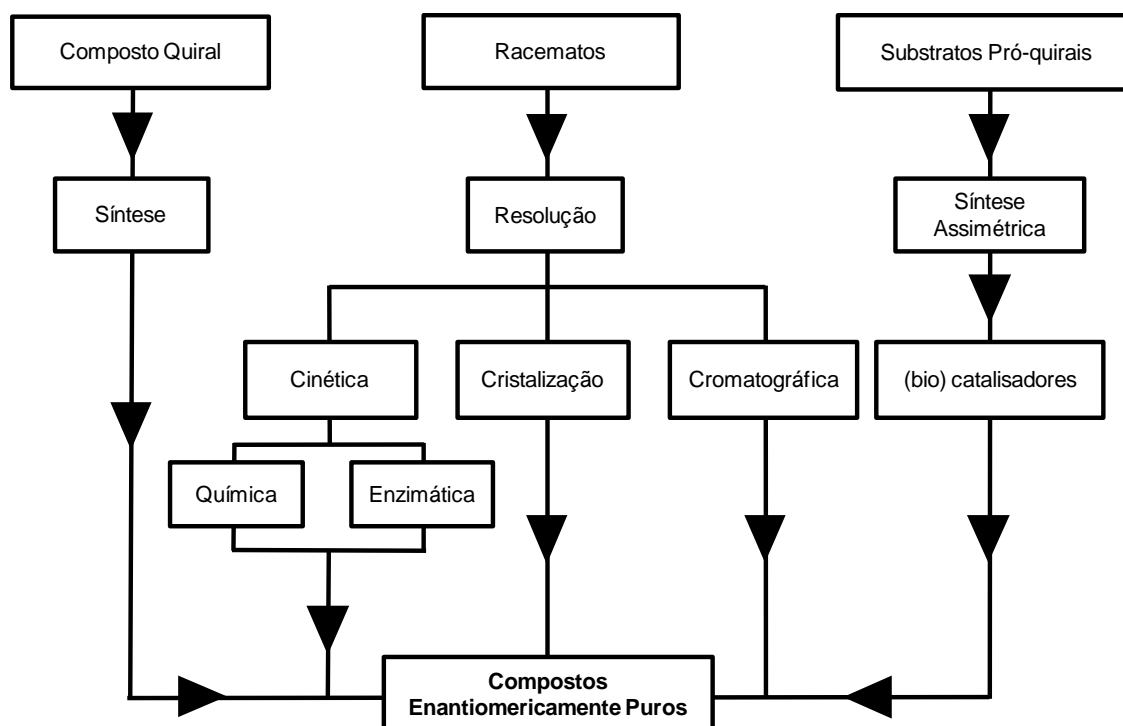


FIGURA 10 – MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE COMPOSTOS ENANTIOMERICAMENTE PUROS

Fonte: Ghanem; Aboul-Enein (2004).

Os substratos pró-quirais possuem um centro ligado a pelo menos dois grupos substituintes iguais; um dos grupos pode ser substituído para formação de um novo estereocentro, desde que os dois outros ligantes também sejam diferentes (CAREY; SUNDBERG, 2007; FABER, 2000). Já as misturas racêmicas possuem a mesma quantidade dos dois enantiômeros, cuja separação é considerada a metodologia mais importante e abrange três diferentes estratégias: cristalização, cromatografia e cinética. A cristalização preferencial é considerada o processo clássico e é aplicada somente quando os enantiômeros são capazes de formar conglomerados, o que corresponde a menos de 20% dos casos. As técnicas de

cromatografia, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em colunas quirais, são empregadas principalmente na separação de isômeros de compostos de alto valor agregado, devido ao elevado custo do processo (BRAGAGNOLO *et al.*, 2004; ABOUL-ENEIN, 2004; BLASER *et al.*, 2001). A terceira alternativa é a resolução cinética, processo no qual um dos enantiômeros do racemato é mais rapidamente convertido no produto por um catalisador quiral do que o outro. O catalisador pode ter origem química ou biológica, como por exemplo, enzimas e, neste caso, o processo é chamado de resolução cinética enzimática. Além de apresentar vantagens do ponto de vista ambiental, a utilização de biocatalisadores promove reações mais rápidas, cerca de 10^{12} vezes, e eficientes em termos de separação dos enantiômeros, devido à elevada enantiosseletividade de algumas enzimas (KAMAL *et al.*, 2008; FABER, 2000).

A resolução cinética enzimática baseia-se na capacidade da enzima de reagir com dois enantiômeros em diferentes velocidades, com formação preferencial de um enantiômero em relação ao outro. Devido ao ambiente quiral do sítio ativo da enzima, na presença do substrato é formado um complexo diastereoisomérico com cada enantiômero de diferentes valores de energia livre (ΔG), nos respectivos estados de transição [EA] e [EB] (FIGURA 11). Dessa forma, se a interação da enzima com um enantiômero for muito mais favorável que a com o outro enantiômero, a velocidade de transformação do primeiro será tão alta que este será totalmente transformado no meio, enquanto o outro enantiômero permanecerá no meio sem reagir. Neste caso, a reação atinge uma conversão ideal de 50%, resultando em um substrato e um produto enantiomericamente puros. Entretanto, quando a diferença das velocidades de reação dos dois enantiômeros não é grande, a reação ocorre de forma lenta e a pureza do substrato e do produto diminui (FABER, 2000; KAZLAUSKAS, 1991).

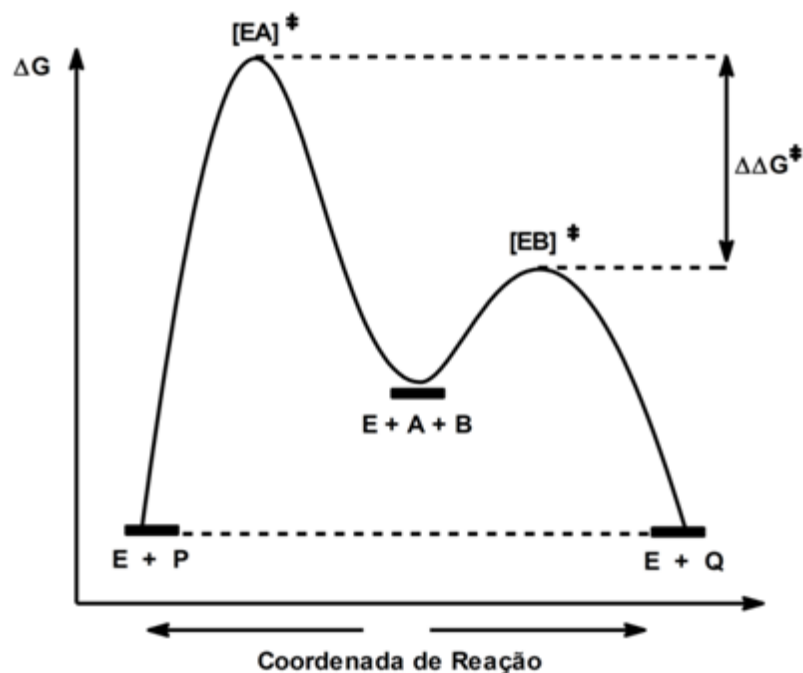


FIGURA 11 – VARIAÇÃO DE ENERGIA LIVRE (ΔG) NA RESOLUÇÃO CINÉTICA DE RACEMATOS POR ENZIMAS

Onde: E representa a enzima, A e B os dois enantiômeros da mistura a ser resolvida, P e Q os dois possíveis produtos e $\Delta\Delta G^\ddagger$ é a energia diferencial de ativação entre os enantiômeros.

Fonte: Temba *et al.* (2003).

2.3.3 Enantiosseletividade de lipases

O reconhecimento quiral por enzimas baseia-se na discriminação entre dois enantiômeros através do seu sítio catalítico. Devido à conformação da estrutura enzimática, qualquer impedimento estérico relacionado ao substrato pode auxiliar a enzima a diferenciar estruturas semelhantes durante o processo de interação enzima-substrato (FABER, 2000; COSTA *et al.*, 1999).

No caso específico de lipases, Kazlauskas *et al.* (1991) propuseram um modelo para explicar o reconhecimento quiral de lipases de *C. rugosa* e *P. cepacia* frente a álcoois secundários, com base no sítio ativo de lipases e no tamanho dos substratos. Neste modelo, o sítio ativo consiste em duas regiões de diferentes tamanhos, um “bolso” grande e outro pequeno (FIGURA 12 A).

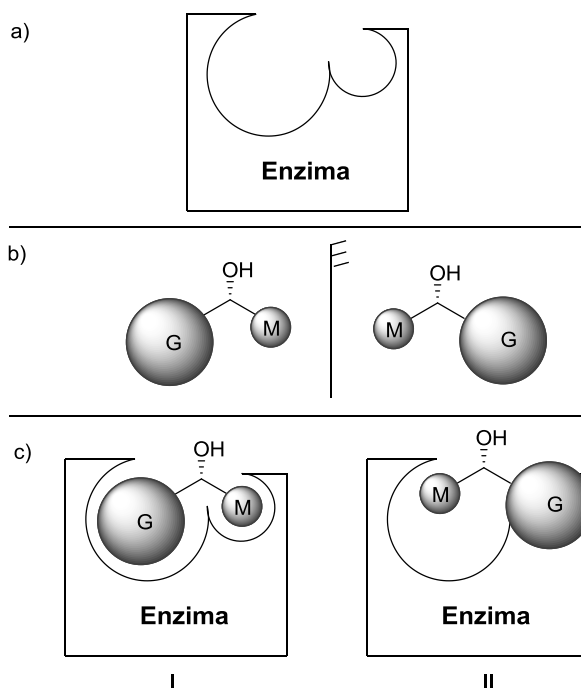


FIGURA 12 – MODELO ESTRUTURAL DO SÍTIO ATIVO DE LIPASES SEGUNDO A REGRA DE KAZLAUSKAS *et al.* (1991)

Em (a) representação do sítio ativo de lipases e (b) enantiômeros de um álcool secundário estericamente impedido como, por exemplo, o 1-fenil-1-etanol, onde o grupo grande (G) é a fenila e o grupo médio (M) corresponde a etila. A diferença de complementaridade estérica está mostrada em (c), em (I) o enantiômero de reação mais rápida e (II) o enantiômero de reação mais lenta.

Fonte: Adaptado de Temba *et al.* (2003).

A regra de Kazlauskas normalmente prevê que lipases possuem preferência pelo enantiômero *R*, levando em consideração o volume dos substituintes ao redor do centro de quiralidade da molécula a ser resolvida, com o grupo hidroxila projetado para trás do plano (FIGURA 12 B). Utilizando como referência o grupo hidroxila do álcool, o grupo grande (G) fica à esquerda, e o grupo médio (M) à direita, ao contrário do seu enantiômero. Assim, os grupos G e M são acomodados em cavidades de tamanhos condizentes, segundo uma geometria denominada de “modo produtivo” (FIGURA 12 C I).

Quando o outro enantiômero interage com o sítio ativo da enzima, é então forçado a acomodar seu maior substituinte no menor espaço (FIGURA 12 C II). Esse encaixe energeticamente desfavorável é chamado de “modo não produtivo”, pois o impedimento estérico entre o substituinte (G) e a cavidade menor supostamente perturba a tríade catalítica, diminuindo a velocidade da reação para este

enantiômero (GHANEM, 2007; KAZLAUSKAS *et al.*, 1991). Apesar de diversas lipases seguirem a regra de Kazlauskas e possuírem enantiopreferência pelo enantiômero *R*, algumas enzimas apresentam um comportamento diferente e têm sido denominadas de anti-Kazlauskas como a lipase produzida pelo fungo *Mucor hiemalis* na resolução do (*R,S*)-1-fenil-1-etanol (NAGY *et al.*, 2006).

Lipases enantiosseletivas possuem grande potencial em biocatálise, principalmente na resolução de racematos com o objetivo de produzir compostos opticamente puros. Essa aplicação é particularmente interessante devido às propriedades químicas semelhantes apresentadas pelos enantiômeros, o que dificulta a resolução química por métodos convencionais de purificação. Entretanto, os enantiômeros podem apresentar atividades farmacológicas estereosseletivas, pois eles podem possuir distintas velocidades de reação com outras moléculas quirais como enzimas, o que justifica a importância de compostos enantiomericamente puros na produção de fármacos e na agroindústria (FABER, 2000; MARCH, 1992).

Um exemplo clássico da importância da enantiosseletividade é a talidomida, que foi sintetizada em 1953 e administrada para minimizar enjoos durante a gravidez. Esse fármaco possui um carbono assimétrico na sua estrutura e, por isso, pode existir nas duas formas opticamente ativas. Apesar disso, a talidomida foi comercializada como racemato, e mais tarde, suas propriedades teratogênicas foram associadas ao distômero (*S*), enquanto o eutômero (*R*) era responsável pelo efeito desejado (MARRIOT; MULLER; DALGLEISH, 1999; DALLY, 1998; WNENDT; ZWINGENBERGER, 1997; ERIKSSON *et al.*, 1995).

O parâmetro utilizado para avaliar a enantiosseletividade de enzimas é a razão enantiomérica (*E*). O valor de *E* é definido como a razão da constante de especificidade para os dois enantiômeros, descrita pela Equação 1.

$$E_{RS} = \frac{(K_{cat}/K_M)_R}{(K_{cat}/K_M)_S} \quad (Eq. 1)$$

onde K_{cat} é a constante de velocidade e K_M é a constante de Michaelis-Menten. Para o cálculo do valor de *E*, Chen *et al.* (1982) desenvolveram uma equação (Eq. 2) baseada em reações uni-uni e irreversíveis, utilizando valores experimentais de excesso enantiomérico (ee_s ou ee_p) e de uma dada fração de conversão (*c*).

$$E = \frac{\ln[(1-C)(1-ee_s)]}{\ln[(1-C)(1+ee_s)]} = \frac{\ln[(1-C)(1-ee_p)]}{\ln[(1-C)(1+ee_p)]} \quad (Eq. 2)$$

O excesso enantiomérico descreve a pureza quiral dos compostos e é descrito pela Equação 3.

$$ee_R (\%) = \left(\frac{R-S}{R+S} \right) \times 100 \quad \text{para } R > S \quad (Eq. 3)$$

onde R é a área do enantiômero R e S a área do enantiômero S obtidas a partir da metodologia analítica utilizada, como por exemplo, a cromatografia. Para uma mistura racêmica, o valor de ee é sempre zero, enquanto que para um composto enantiomericamente puro é 1 ou 100% (GHANEM, 2007). Segundo Ghanem (2007), valores de E iguais a 1 correspondem a uma reação não seletiva e para uma resolução cinética ser considerada válida o valor de E dever ser no mínimo 20. Geralmente, enzimas utilizadas em resoluções devem possuir um valor de E de 50 ou maior, sendo que valores de E superiores a 100 são considerados excelentes (SUNNA *et al.*, 2002).

2.3.4 Controle dos parâmetros de enantiosseletividade

A enantiosseletividade de lipases depende da origem da enzima, das propriedades químicas do substrato e das condições reacionais utilizadas. Além disso, alterações no sítio ativo, provocadas por modificações na estrutura tridimensional da enzima, podem afetar os parâmetros de enantiosseletividade enzimática (ROGALSKA *et al.*, 1995; ROGALSKA *et al.*, 1993; RANSAC *et al.*, 1990). Neste contexto, diversos autores têm estudado as consequências de variações reacionais nos parâmetros de enantiosseletividade de enzimas (EMA *et al.*, 2005; KRISHNA, 2002; BORNSCHEUER, 2002; BERGLUND, 2001).

Dentre os parâmetros avaliados no controle da enantiosseletividade de lipases, os principais são: o suporte de imobilização - quanto ao tamanho dos poros e ao tipo de material; a hidrofobicidade do solvente utilizado; a temperatura e os

grupos substituintes do substrato e seus efeitos estéricos na interação com o sítio ativo da enzima (AHMED *et al.*, 2012; SABBANI *et al.*, 2006; EMA *et al.*, 2005; KRISHINA, 2002; BORNSCHEUER, 2002; BERGLUND, 2001; KIM, 2001). Outra abordagem estudada é a variação dos doadores acila em reações de transesterificação (EMA *et al.*, 1996).

2.3.4.1 Efeito do solvente

Os solventes orgânicos utilizados nas reações têm sua importância frequentemente associada à maior solubilidade dos substratos hidrofóbicos e ao deslocamento do equilíbrio da reação para o sentido da síntese (KRIEGER *et al.*, 2004). Além disso, solventes orgânicos têm apresentado influência sobre a enantiosseletividade de lipases. Essa influência, geralmente, é justificada pelas modificações tridimensionais da enzima devido a interações das cadeias laterais da proteína com o meio reacional (COSTA; AMORIM, 1999). No entanto, os efeitos na atividade e enantiosseletividade de lipases variam muito de um solvente para o outro devido às suas propriedades intrínsecas, o que torna difícil a predição de seus efeitos. Os mecanismos da influência de solventes na enantiosseletividade de enzimas ainda são pouco esclarecidos e, como consequência, a maior parte dos trabalhos trata o assunto de forma empírica. Portanto, se fazem necessários estudos sistemáticos da utilização de solventes nas reações catalisadas por lipases, principalmente nas reações de resolução cinética (LIU *et al.*, 2014; CHUA; SARMIDI, 2006; COSTA; AMORIM, 1999).

Contudo, algumas características dos solventes como a estrutura e hidrofobicidade têm sido relacionadas às alterações nos parâmetros de enantiosseletividade de lipases. Neste contexto, Fitzpatrick e Klivanov (1991) constataram que a lipase pancreática suína tinha a sua enantiosseletividade alterada na resolução do (*R,S*)-álcool-sec-(2-naftil)etil dependendo do solvente utilizado, mas essa alteração não apresentou correlação com a hidrofobicidade dos solventes utilizados. Já em 1999, Mohapatra e Hsu averiguaram que o aumento da polaridade do solvente orgânico diminuiu a enantiosseletividade da lipase de *P. cepacia* (Amano®) na resolução de um intermediário da síntese de β -bloqueadores. Persson

et al. (2002) também relataram um aumento no valor de E das lipases de *C. rugosa* e de *R. oryzae* com a diminuição da polaridade do solvente na resolução do (*R,S*)-ácido-2-fenilpropionico. Este mesmo comportamento foi observado por Liu *et al.* (2008), na esterificação de (*R,S*)-ibuprofeno pela lipase isolada de *Candida sp.* e por Yu *et al.* (2007), na transesterificação de (*R,S*)-2-octanol catalisada pela lipase de *P. cepacia*.

2.3.4.2 Efeito da temperatura

A temperatura está diretamente relacionada com a velocidade das reações catalisadas por enzimas; o aumento da temperatura gera um aumento na energia cinética dos reagentes e, dessa forma também aumenta a transferência de massa. No entanto, esse aumento da temperatura pode elevar a velocidade de desnaturação da enzima (AL-ZUHAIR *et al.*, 1996). Desta forma, é importante determinar uma temperatura que favoreça a velocidade da reação, mas que também não promova a desnaturação térmica da lipase. A temperatura ideal para a atividade enzimática depende das características de atividade e estabilidade intrínsecas de cada enzima e da forma como ela se encontra, por exemplo, livre ou imobilizada. Além disso, a temperatura para a atividade ótima de uma enzima depende das condições reacionais empregadas, como o tempo, meio de reação e o substrato utilizado. Consequentemente, a temperatura influencia de forma substancial os valores de conversão das reações utilizando lipases e, com relação à enantiosseletividade, pode aumentar ou diminuir os valores de E . Geralmente, reações catalisadas pela mesma enzima possuem energias de ativação diferentes. Consequentemente, a enantiosseletividade enzimática pode variar de acordo com a temperatura utilizada na reação, devido às alterações na energia de ativação provocadas pela variação da temperatura (PERSSON *et al.*, 2002).

Apesar da variação de temperatura ser um dos parâmetros mais fáceis de avaliar, o mecanismo pelo qual a temperatura influencia a enantiosseletividade das enzimas ainda não está totalmente elucidado. Em geral, temperaturas altas levam a menor enantiosseletividade e quanto maior a diferença entre as barreiras energéticas entre os dois enantiômeros mais a temperatura influencia na

enantiosseletividade da reação (DABKOWSKA; SZEWCZYK, 2009); entretanto, esse comportamento é variável (PHILLIPS, 1996). Persson *et al.* (2002) relataram que o valor de E da resolução do (*R,S*)-ácido-2-fenilpropiónico foi indiretamente proporcional à temperatura e o mesmo comportamento foi observado por Yu *et al.* (2007). No entanto, a velocidade e o valor de E da resolução de (*R,S*)-ésteres de ibuprofeno pela lipase de *C. cylindracea* aumentaram com a temperatura (LEE *et al.*, 1995).

2.3.4.3 Efeito do doador acila

A reação de transesterificação segue um mecanismo no qual a lipase reage primeiro com o doador acila para formar o complexo intermediário acil-enzima e depois reage com o álcool quiral. A partir desse comportamento, foi fundamentada a hipótese de que a combinação das estruturas do álcool e do doador acila causaria um efeito de memória induzida na lipase, que poderia influenciar as reações catalisadas pela enzima (REETZ, 2002).

Além disso, uma das estratégias para aumentar a conversão de reações de transesterificação é a utilização de doadores acila que possuam a capacidade de ser convertidos em produtos voláteis – deslocando o sentido da reação para a síntese. Por exemplo, o uso dos ésteres de vinila ou isopropenila que produzem os álcoois vinílico ou isopropenílico, respectivamente, que são tautomerizados aos voláteis aceto-aldeído ou acetona (AHMED *et al.*, 2012; CHÊNEVERT; PELCHAT; MORIN, 2009). Porém, algumas lipases podem ser desativadas pelo aceto-aldeído, como por exemplo, as lipases de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* (AHMED *et al.*, 2012; AKAI *et al.*, 2000).

2.3.4.4 Efeito da concentração do substrato

Outro aspecto que deve ser levado em consideração no estudo da enantiosseletividade de lipases é a concentração do substrato utilizado na reação.

Como as reações de esterificação catalisadas por lipases em solventes orgânicos são reversíveis, o emprego de um excesso de um dos substratos é frequentemente utilizado para deslocar o equilíbrio da reação no sentido da síntese do produto desejado. Esse deslocamento do equilíbrio da reação aumenta o rendimento e o excesso enantiomérico do produto, além de aumentar os valores de conversão (BERGLUND, 2001).

No entanto, o excesso molar de um álcool primário simples levou a um baixo excesso enantiomérico do éster formado pela resolução cinética de ácidos quirais pela lipase de *Candida rugosa* (YASUFUKU; UEJI, 1997; EDLUND *et al.*, 1996). Este fenômeno de inibição pelo álcool também foi observado em outros trabalhos, nos quais um excesso enantiomérico maior é obtido quando uma menor quantidade de álcool é utilizada nas reações (WU; LIU, 2000; WU; LIANG, 1999). Essa inibição, provocada pelo excesso do álcool, faz com que seja interessante avaliar o excesso do doador acila nas reações de transesterificação enantiosseletiva.

2.3.5 Resolução cinética de álcoois secundários por lipases

Os álcoois, devido à facilidade com que são funcionalizados, pertencem a uma classe de compostos versáteis utilizados em aplicações sintéticas, como intermediários químicos, principalmente na síntese de fármacos quirais e fragâncias. Além disso, esses intermediários podem ser empregados como blocos quirais (*chiral building blocks*) na síntese de diversos compostos de importância biológica e como mistura racêmica para o estudo de resolução cinética catalisada por lipases (OMORI *et al.*, 2007; GOTOR-FERNÁNDEZ; BRIEVA, GOTOR, 2006; ABATE *et al.*, 2004). Em geral, lipases são mais eficientes na resolução cinética de álcoois secundários do que na de álcoois primários ou terciários, sendo este comportamento justificado pelas diferenças na acomodação destes substratos no sítio ativo da enzima (GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2005).

A reação de transesterificação catalisada por lipases em solventes orgânicos é a metodologia mais utilizada na resolução cinética de álcoois. A partir dessa reação enantiosseletiva, os enantiômeros resultantes do substrato e do produto

podem ser separados por técnicas cromatográficas (GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2005; GHANEM; SCHURIG, 2003).

Nagy *et al.* (2006) utilizaram sólido fermentado com atividade lipolítica em reações de resolução cinética dos álcoois (*R,S*)-1-fenil-1-etanol, (*R,S*)-1-ciclohexil-1-etanol e (*R,S*)-1-naftil-2-etanol. Os valores de *E* foram considerados excelentes (>200) na resolução do álcool (*R,S*)-1-fenil-1-etanol utilizando sólido fermentado produzido pelos fungos *Chaetomium elatum*, *Gliocladium catenulatum* e *Scopulariopsis brevicaulis*. Apesar de a maioria das lipases testadas ter apresentado preferência pelo enantiômero *R*, as lipases produzidas pelo fungo *Mucor hiemalis* mostraram possuir um comportamento anti-Kazlauskas, ou seja, preferência pelo enantiômero *S* na resolução do álcool (*R,S*)-1-fenil-1-etanol em 120 h de reação, porém com baixo valor de *E* (15).

Em 2006, Kiss *et al.* utilizaram as lipases de *B. cepacia* (Amano®) e de *C. Antarctica* (Novozymes 435®) imobilizadas na resolução de álcoois secundários, que apresentaram valores de *E* maiores que 100 para derivados de fenil-2-propanol. Mais recentemente, Moure *et al.* (2014) utilizaram a lipase de *Burkholderia cepacia* LTBE11, livre e imobilizada, na transesterificação enantiosseletiva de quatro álcoois alílicos secundários, 1-fenilprop-2-en-1-ol, p-clorofenilprop-2-en-1-ol, (m-metoxifenil)prop-2-en-1-ol, 5-metilhex-1-en-3-ol e estudaram a influência de vários fatores na enantiosseletividade da lipase, dentre eles a imobilização, os grupos substituintes dos substratos, temperatura, solventes utilizados e quantidade de enzima adicionada ao meio reacional. Os autores conseguiram aumentar o valor de *E* obtido na resolução de (*R,S*)-1-(4-clorofenil)prop-2-en-1-ol de 19 para 110, através da utilização da enzima imobilizada e da escolha apropriada de temperatura e solvente.

3 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral estudar a enantiosseletividade das lipases presentes no sólido fermentado produzido por *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM na resolução cinética de álcoois secundários produzidos por síntese química.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar o sólido fermentado quanto à atividade de hidrólise frente a substratos de diferentes comprimentos de cadeia e quanto à atividade de esterificação;
2. Verificar a influência dos seguintes parâmetros em reações de transesterificação de álcoois secundários:
 - Tipo de solvente, quanto a diferentes valores de $\log P$;
 - Tipo de doador acila, em sistema com solvente e livre de solvente, quanto às suas estruturas;
 - Temperatura;
 - Quantidade de atividade enzimática no meio reacional;
 - Efeito da concentração dos substratos;
 - Tipo de grupo substituinte do anel aromático dos álcoois secundários.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios experimentais deste trabalho foram realizados no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB), no Laboratório do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS) e no Laboratório de Síntese Química e Enzimática (LaSQuE), situados na Universidade Federal do Paraná (UFPR).

4.1 ESTRATÉGIA DE AÇÃO

O diagrama apresentado na FIGURA 13 contém a estratégia de ação utilizada neste trabalho, que é dividido em 5 etapas principais. Os métodos utilizados estão descritos a seguir.

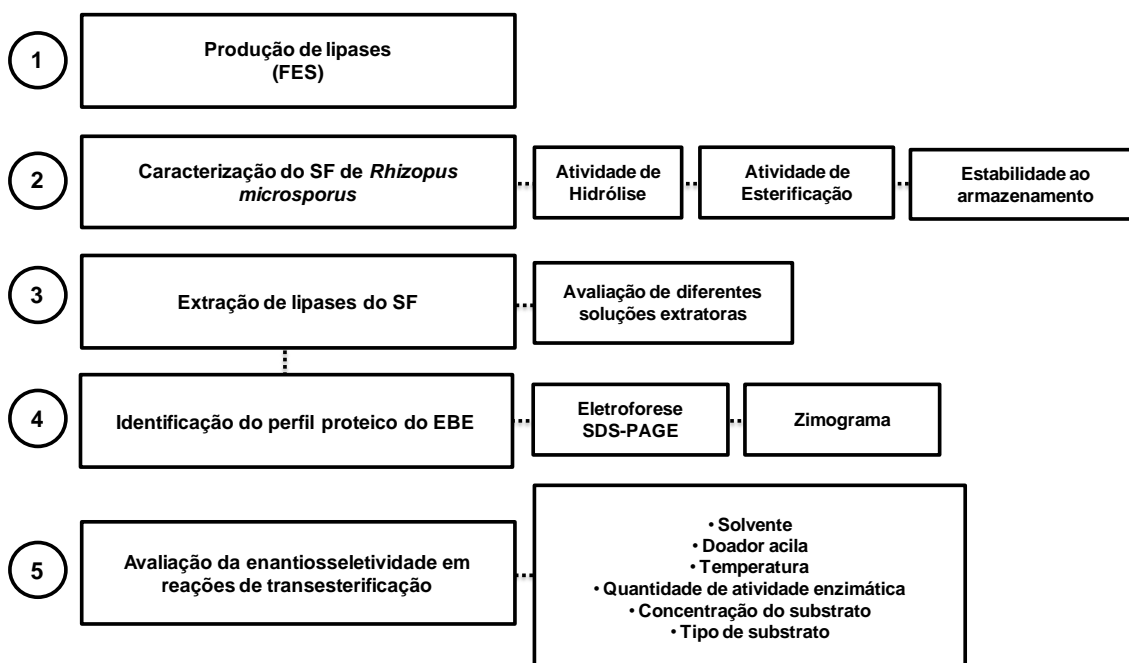


FIGURA 13 – ESTRATÉGIA DE AÇÃO

4.2 MATERIAIS E REAGENTES

Os compostos trioleína (65%), tricaprilina (99%), tributirina (98%) e ácido oleico (99%) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). Os solventes orgânicos foram adquiridos da Vetec (RJ, Brasil) e utilizados sem tratamento prévio. O bagaço de cana foi doado pela Companhia Melhoramentos Norte do Paraná (Paraná, Brasil). O óleo de soja Liza da Cargill (São Paulo, Brasil) foi adquirido em um mercado local. O substrato (*R,S*)-1-fenil-1-etanol e seus derivados foram sintetizados e caracterizados no Laboratório de Síntese Química e Enzimática (LaSQuE) do Departamento de Química desta universidade, pela aluna de Iniciação Científica Talita Cadorin Fraiz, sob orientação do Prof. Dr. Leandro Piovan. Os demais reagentes atenderam ao grau analítico e de pureza requeridos nos experimentos.

4.3 PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

4.3.1 Micro-organismo e preparo do inóculo

A produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES) foi realizada utilizando a cepa fúngica *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (ALBERTON *et al.*, 2010). Para manutenção, o micro-organismo foi inoculado em tubos inclinados contendo o meio Batata, Dextrose, Ágar (BDA) e incubado a 30 °C durante 7 dias. Os tubos contendo o micélio fúngico foram, então, recobertos com óleo mineral estéril e mantidos à temperatura ambiente.

Para o preparo do inóculo, removeu-se, com alça de Henle (alça de platina), um pedaço de aproximadamente 2 mm do micélio de *R. microsporus* dos tubos inclinados preparados como descrito acima. Em seguida, o micélio foi inoculado em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio BDA, que foram incubados por 7 dias em estufa, a 30 °C. Após esse período de incubação, os esporos foram coletados com alça de platina por raspagem e suspensos em uma solução de água

destilada estéril e Tween 80 0,01% (m V⁻¹). A concentração de esporos na suspensão foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Esta suspensão de esporos foi imediatamente utilizada como inóculo dos cultivos em estado sólido.

4.3.2 Cultivos em estado sólido

As lipases foram produzidas por um método de FES já otimizado por Alberton *et al.* (2010) e Zago *et al.* (2014), utilizando bagaço de cana-de-açúcar suplementado com uréia e solução salina, conforme descrito a seguir.

O bagaço de cana foi submetido à lavagem prévia (três vezes com água da torneira) e seco em estufa a 80 °C até massa constante (DIAZ *et al.*, 2006). Devido à heterogeneidade do tamanho das partículas, o bagaço de cana foi peneirado antes da fermentação e somente a fração com partículas entre 0,8 e 2,0 mm de diâmetro foi utilizada na FES.

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 4 g de bagaço de cana (base seca), que foram impregnados com 20 mL de uma solução umedecedora nutriente, cuja composição está descrita no item 4.3.3, e 0,8 g de óleo de soja, que foi utilizado como fonte de carbono e indutor da produção de lipases. Após o preparo, os frascos com substratos foram esterilizados em autoclave a 120 °C durante 15 min.

Depois da esterilização e resfriamento, o substrato sólido foi inoculado com o volume requerido da suspensão de esporos, preparada como descrito no item 4.3.1, correspondente a aproximadamente $3,7 \times 10^7$ esporos por grama de substrato seco (g⁻¹SS). O teor de umidade inicial do sólido era de cerca de 80% (m m⁻¹), que foi determinado com 1 g de amostra em balança de infravermelho Gehaka modelo IV de 2000 (São Paulo, Brasil).

Os frascos inoculados foram incubados em estufa a 40 °C durante 18 h, de acordo com o estudo cinético de produção de lipases realizado por Botton (2012). Posteriormente aos cultivos, o sólido foi liofilizado durante 24 h a -45 °C e 0,1 mbar num liofilizador Jouan LP3[®] modelo 60 (Frederiksborg, Dinamarca) e o teor final de umidade foi cerca de 20% (m m⁻¹).

4.3.3 Preparo da solução umedecedora

A solução umedecedora do sólido foi preparada segundo Rodriguez *et al.* (2006) e continha: uréia (4 g L^{-1}); lactose (5 g L^{-1}); K_2HPO_4 (5 g L^{-1}); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g L^{-1}) e solução de oligoelementos (4 mL L^{-1}). O valor do pH da solução mineral foi ajustado para 7,0 com HCl 10% (V V^{-1}). O óleo foi adicionado a esta solução que, em seguida, foi emulsionada em vórtex por 1 min.

A solução de oligoelementos continha: EDTA (10 g L^{-1}), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($1,98 \text{ g L}^{-1}$); $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($2,81 \text{ g L}^{-1}$); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,47 \text{ g L}^{-1}$); $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,17 \text{ g L}^{-1}$); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,29 \text{ g L}^{-1}$). A fim de dissolver os componentes, o pH da solução de oligoelementos foi ajustado para 4,0 com HCl 10% (V V^{-1}).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO

Para caracterizar o sólido fermentado, foram determinadas suas atividades de hidrólise, de esterificação e a estabilidade ao armazenamento.

4.4.1 Determinação da atividade de hidrólise

A determinação da atividade de hidrólise do sólido fermentado (SF) foi realizada pelo método titulométrico (item 4.7.1), tanto para o sólido fermentado úmido (SFU), quanto para o liofilizado (SFL). Foram testados três triacilgliceróis (TAGs): tributirina (C4), tricaprilina (C8) e trioleína (C18:1).

4.4.2 Determinação da atividade de esterificação

A determinação da atividade de esterificação do SFL foi realizada através da reação de síntese do oleato de etila (item 4.7.2). As alíquotas foram analisadas quanto ao seu teor de ácido oleico residual, de acordo com a metodologia proposta por Lowry-Tinsley (1976) descrita no item 4.7.3.

4.4.3 Estabilidade ao armazenamento

Após o cultivo em estado sólido, o sólido fermentado seco foi armazenado em sacos plásticos a -18 °C. A estabilidade ao armazenamento foi determinada mensalmente através da determinação da atividade de hidrólise (item 4.7.1) de alíquotas do material.

4.5 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO EXTRACELULAR

O extrato bruto foi preparado com a finalidade de identificar as lipases extracelulares produzidas por *R. microsporus*. Para tanto, foram realizados ensaios de extração, eletroforese SDS-PAGE e zimograma.

4.5.1 Extração das lipases do sólido fermentado

O extrato bruto extracelular foi preparado através do processo de extração (MITCHELL *et al.*, 2002) utilizando o sólido fermentado úmido e três soluções aquosas: NaCl 2% (m V⁻¹), tampão Tris-HCl pH 8,0 (0,02 mol L⁻¹) com Triton X-100 0,5% (m V⁻¹) e tampão fosfato pH 7,0 (0,02 mol L⁻¹). A extração foi realizada em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g do sólido fermentado úmido e 50 mL

da solução aquosa, sob agitação de 200 rpm, a 30 °C por 3 h. Em seguida, a mistura foi filtrada em tecido tipo Perfex[®] e o sólido foi prensado manualmente para obtenção do extrato enzimático bruto. Para inibir qualquer crescimento microbiano e prolongar a durabilidade do extrato, adicionou-se azida sódica 0,02% (m V⁻¹) ao líquido, que no fim dessa etapa, foi denominado de “extrato bruto extracelular” ou EBE.

4.5.2 Determinação da atividade lipolítica

Nesta etapa, foi determinada a atividade lipolítica dos extratos preparados com as três soluções aquosas, conforme descrito no item 4.5.1, frente à tricaprilina (C8). Todas as dosagens de atividade foram feitas pelo método titulométrico (item 4.7.1). Para comparar os ensaios de extração, foram realizados ensaios de determinação da atividade de hidrólise e de proteínas (item 4.7.4).

Depois de escolhida a solução extratora, para determinar a atividade de esterificação (item 4.7.2), o extrato bruto extracelular foi liofilizado durante 24 h a -45 °C e 0,1 mbar num liofilizador Jouan LP3[®] modelo 60 (Frederiksborg, Dinamarca).

4.5.3 Eletroforese SDS-PAGE e zimograma

As amostras do EBE foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE, conforme descrito por Laemmli (1970), a fim de conhecer o perfil proteico deste extrato, que foi obtido como descrito no item 4.5.1 utilizando a solução aquosa de NaCl 0,2% (m V⁻¹). Diluíram-se as amostras do extrato em tampão Tris-HCl pH 7,5 (0,5 mol L⁻¹), contendo SDS 10% (m V⁻¹), glicerol 10% (V V⁻¹), 2-mercaptoetanol 5% (V V⁻¹) e azul de bromofenol 0,02% (m V⁻¹). A concentração de poliacrilamida utilizada foi de 5% e 12% (m V⁻¹) para o gel de empilhamento e de separação, respectivamente. Como marcadores de massa molecular foram utilizadas as seguintes proteínas: fosforilase b (97 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbumina (45kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-La (14,4 kDa)

produzidas pela Pierce Biotechnology (IL, EUA). Após a corrida, o gel foi corado com azul brilhante de Coomassie R-250 0,05% (V V⁻¹).

A detecção de atividade lipolítica nas bandas do gel de SDS-PAGE foi realizada através de zimograma, conforme protocolo descrito na literatura (OH *et al.*, 1999). Metade do gel foi utilizada para o zimograma, enquanto a outra metade foi corada com azul brilhante de Coomassie R-250 e utilizada para localização da banda da enzima. Assim, o extrato bruto extracelular, sem fervura prévia, foi aplicado em vários poços do gel de eletroforese. Após a corrida, o SDS foi removido com agitação suave do gel por 10 min em tampão Tris-HCl pH 8,0 (0,05 mol L⁻¹) contendo Triton X-100 1% (m V⁻¹) e duas vezes em tampão Tris-HCl isento de detergente. Posteriormente, o gel de eletroforese foi colocado em placas de Petri contendo uma emulsão de ágar com trioleína para detecção da atividade lipolítica e incubado a 30 °C, até o aparecimento de halos de hidrólise, observados sob luz ultravioleta (UV). A emulsão de ágar com o substrato foi preparada com ágar 1,3% (m V⁻¹), trioleína 1% (V V⁻¹), Tris-HCl pH 8,0 (0,025 mol L⁻¹), CaCl₂ (0,001 mol L⁻¹) e Rhodamina B 0,002 % (m V⁻¹).

4.6 ENSAIOS DE ENANTIOSSELETIVIDADE

Esse estudo foi realizado apenas com o sólido fermentado liofilizado, devido à ausência de atividade de esterificação no extrato bruto liofilizado. A reação de resolução cinética enzimática foi avaliada de acordo com os seguintes parâmetros: efeito do solvente (*n*-heptano, *n*-hexano, *tert*-butanol, THF e éter metil-*tert*-butílico), do doador acila (acetato de etila, de vinila e de isopropenila), da quantidade de atividade enzimática no meio reacional (150, 185 e 460 U), da temperatura (35, 40 e 45 °C) e dos substratos (1-fenil-1-etanol, *p*-nitro-fenil-1-etanol e *p*-metoxi-fenil-1-etanol).

4.6.1 Reação de resolução cinética enzimática

As condições reacionais variaram conforme requerido nos experimentos. Em um procedimento padrão, definiram-se as condições da reação de transesterificação: 150 U (unidades de atividade enzimática adicionadas ao meio reacional, determinadas pelo método descrito no item 4.7.1), 0,1 mmol de 1-fenil-1-etanol, 0,4 mmol de acetato de vinila e 8 mL de solvente orgânico. As reações (FIGURA 14) foram realizadas em vials de vidro de 50 mL hermeticamente fechados com tampas de Teflon® e vedados com Parafilm®, em agitador orbital a 35 °C e 200 rpm. Ao longo do tempo, alíquotas de 80 µL foram retiradas e analisadas por cromatografia gasosa com coluna com fase estacionária quiral (item 4.7.5). Os controles foram feitos com o sólido fermentado esterilizado em autoclave a 120 °C durante 15 min.

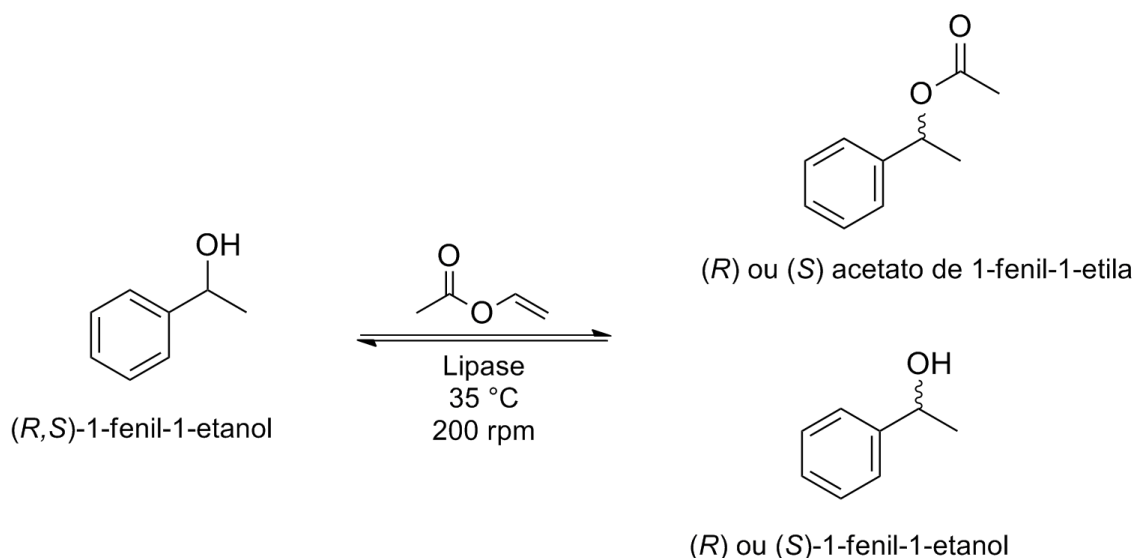


FIGURA 14 – REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ENTRE O ÁLCOOL 1-FENIL-1-ETANOL E ACETATO DE VINILÁ CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO

4.6.2 Efeito do solvente

Os solventes THF (log *P* 0,46), éter metil-*terc*-butílico (log *P* 1,43), *terc*-butanol (log *P* 1,45), *n*-hexano (log *P* 3,5) e *n*-heptano (log *P* 4,0) foram avaliados na

resolução cinética de (*R,S*)-1-fenil-1-etanol catalisada pelo sólido fermentado com atividade lipolítica. As reações foram feitas de acordo com o item 4.6.1.

4.6.3 Efeito do doador acila

Como doadores do grupo acila foram testados o acetato de etila, de vinila e de isopropenila (FIGURA 15). As reações foram feitas de acordo com o item 4.6.1. Esses compostos também foram testados como solventes de reação; para isso, os doadores acila (8 mL) foram adicionados ao meio reacional contendo 150 U (unidades de atividade enzimática) e 0,1 mmol de (*R,S*)-1-fenil-1-etanol.

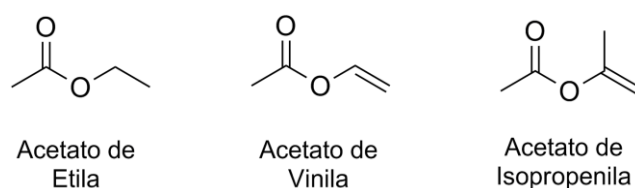


FIGURA 15 – ESTRUTURA DOS DOADORES ACILA UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO

4.6.4 Efeito da temperatura

Para avaliar o efeito da temperatura nos parâmetros de enantiosseletividade enzimática, foram utilizadas três temperaturas: 35, 40 e 45 °C. As reações foram realizadas utilizando 185 U, 0,1 mmol de (*R,S*)-1-fenil-1-etanol na presença de 0,4 mmol de acetato de isopropenila e 8 mL de *n*-heptano, conforme descrito no item 4.6.1.

4.6.5 Efeito da quantidade de atividade enzimática

A quantidade inicial de atividade enzimática na reação foi de 150 U, determinadas de acordo com o item 4.7.1. Outras quantidades (185 e 460 U) foram utilizadas para a resolução cinética de 0,1 mmol de (*R,S*)-1-fenil-1-etanol na presença de 0,4 mmol de acetato de isopropenila e 8 mL de *n*-heptano, em agitador orbital a 40 °C, conforme descrito no item 4.6.1.

4.6.6 Efeito da concentração do substrato

Devido ao fenômeno de inibição enantiosseletiva provocado pelo excesso de álcool em reações de esterificação relatado por vários autores, para avaliar o efeito do aumento da concentração do substrato, a concentração de doador acila na reação foi aumentada 44 vezes. As reações foram realizadas a 40 °C, conforme descrito no item 4.6.1 (WU; LIU, 2000; WU; LIANG, 1999; YASUFUKU; UEJI, 1997; EDLUND *et al.*, 1996).

4.6.7 Efeito do tipo de substrato

O substrato (*R,S*)-1-fenil-1-etanol e seus derivados são considerados modelos para a avaliação da enantiosseletividade de lipases, pois os grupos substituintes do álcool 1-fenil-1-etanol foram utilizados para a formulação da regra de Kazlauskas – regra que leva em consideração o volume dos substituintes ao redor do centro de quiralidade do substrato utilizado na reação de resolução cinética (KAZLAUSKAS *et al.*, 1991). Portanto, além do substrato (*R,S*)-1-fenil-1-etanol, foram testados os álcoois quirais (*R,S*)-*p*-nitro-fenil-1-etanol e (*R,S*)-*p*-metoxi-fenil-1-etanol (FIGURA 16). As reações foram realizadas utilizando 185 U, 0,5 mmol de substrato na presença de 22 mmol de acetato de isopropenila e 8 mL de *n*-heptano, a 40 °C, conforme descrito no item 4.6.1.

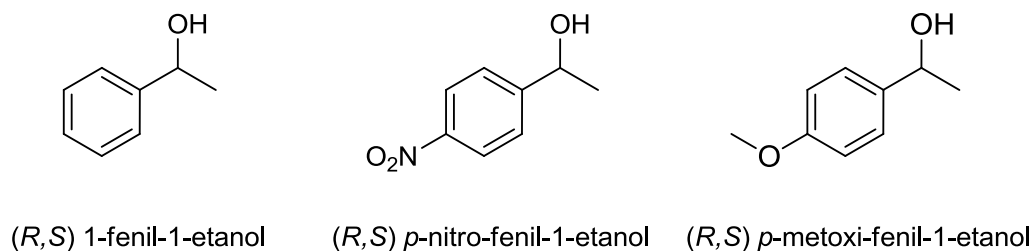


FIGURA 16 – ESTRUTURA DOS ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS QUIRAIS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO

O excesso estequiométrico do doador acila (acetato de isopropenila) foi baseado nas condições utilizadas por Moure *et al.* (2014), visando a aplicação do modelo matemático proposto por Mitchell *et al.* (2010) para determinação dos valores das razões enantioméricas (*E*) e conversões (*c*), conforme descrito no item 4.6.1.

4.6.8 Determinação dos valores de excessos enantioméricos, conversão e razões enantioméricas

O método utilizado para determinação da pureza enantiomérica foi a cromatografia em fase gasosa quiral (item 4.7.5). Neste método, os enantiômeros sofrem interações diastereoisoméricas rápidas e reversíveis com a fase estacionária de ciclodextrina, sendo eluídos em velocidades diferentes e, portanto, com tempos de retenção distintos. Após a resolução dos enantiômeros pela fase estacionária quiral, o cromatograma fornece a composição enantiomérica da amostra. Tais mensurações podem ser efetuadas com um alto grau de precisão ($\pm 0,05\%$), o que garante a fidedignidade dos resultados (SCHURIG, 2002; SCHURIG, 2001; VETTER; SCHURIG, 1997).

As configurações absolutas dos enantiômeros foram determinadas de forma indireta pela comparação com os resultados da resolução cinética enzimática utilizando a lipase comercial de *Candida antarctica* B – CALB (Novozymes, Bagsværd, Dinamarca). Esta lipase é seletiva para o enantiômero *R* (*R*-seletiva) em

relação a álcoois secundários, o que possibilita sua utilização como padrão de enantiosseletividade (HABULIN *et al.*, 2009; OVERMEYER *et al.*, 1999; ALMEIDA *et al.*, 1998).

Os excessos enantioméricos de substrato (ee_s) e produto (ee_p) foram determinados pela diferença das áreas de cada enantiômero observadas no cromatograma, conforme a Equação 4, onde S é a área do enantiômero S e R é a área do enantiômero R .

$$ee (\%) = \left(\frac{S-R}{S+R} \right) \times 100 \quad (Eq. 4)$$

Os valores de conversão (c) e razão enantiomérica (E), quando a determinação foi pontual, ou seja, utilizando um único tempo de reação, foram determinados segundo Chen *et al.* (1982), a partir das Equações 5 e 6.

$$c (\%) = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad (Eq. 5)$$

$$E = \frac{\ln[(1-C)(1-ee_s)]}{\ln[(1-C)(1+ee_s)]} \quad (Eq. 6)$$

onde ee_s corresponde ao excesso enantiomérico do substrato, ee_p corresponde ao excesso enantiomérico do produto, c corresponde à conversão (%) e E é a razão enantiomérica, que define a enantiosseletividade da enzima.

4.6.9 Determinação da razão enantiomérica (E) através de modelo matemático

Os valores de razão enantiomérica (E) calculados pela equação de Chen *et al.* (1982) variaram ao longo do tempo. Esta variação não era esperada, pois esse parâmetro enzimático é uma constante de especificidade da enzima; portanto, desde que o meio reacional não seja alterado, deve ser constante ao longo de toda a reação (STRAATHOF; JONGEJAN, 1997). Devido a este problema, outra metodologia foi utilizada com o objetivo de determinar E , que é o modelo matemático

A partir do esquema de reação apresentado na Figura 4, é possível deduzir as seguintes equações:

$$\frac{dQ_R}{dG} = \frac{E \cdot B_R}{E \cdot B_R + B_S} = - \frac{dB_R}{dG} \quad (\text{Eq. 7})$$

$$\frac{dQ_S}{dG} = \frac{B_S}{E \cdot B_R + B_S} = - \frac{dB_S}{dG} \quad (\text{Eq. 8})$$

onde E é a razão enantiomérica, B_R , B_S , Q_R e Q_S são as frações molares das espécies B_R , B_S , Q_R e Q_S , respectivamente, e G é o grau da reação.

As frações molares usadas nas Equações 7 e 8 são definidas pelas seguintes expressões:

$$B_R = \frac{[B_R]}{[B_R]_0 + [B_S]_0} \quad (\text{Eq. 9})$$

$$B_S = \frac{[B_S]}{[B_R]_0 + [B_S]_0} \quad (\text{Eq. 10})$$

$$Q_R = \frac{[Q_R]}{[B_R]_0 + [B_S]_0} \quad (\text{Eq. 11})$$

$$Q_S = \frac{[Q_S]}{[B_R]_0 + [B_S]_0} \quad (\text{Eq. 12})$$

O grau de reação, equivalente à conversão, é definido por:

$$G = \frac{[G]}{[B_R]_0 + [B_S]_0} = \frac{[Q_R] + [Q_S]}{[B_R]_0 + [B_S]_0} \quad (\text{Eq. 13})$$

onde $[B_R]_0$ e $[B_S]_0$ são as concentrações iniciais dos dois enantiômeros dos substratos quirais, G pode variar de 0 (nenhum produto quiral formado) até 1 (todo o substrato quiral convertido em produtos quirais).

A estratégia para usar as equações 7 e 8 para determinar E , a partir deste conjunto de dados, foi descrita por Mitchell *et al.* (2008) e envolve as seguintes etapas:

- admite-se que as frações molares originais sejam $B_R = B_S = 0,5$ e $Q_R = Q_S = 0$;
- define-se um vetor de valores de E ;
- para cada valor de E (iterativamente):
 - integra-se as equações para a obtenção dos perfis de B_R e B_S (esta etapa foi feita por um programa escrito em FORTRAN que usa a sub-rotina DRKGS. Esta sub-rotina emprega o método de Runge-Kutta para realizar a integração numérica);
 - calcula-se a soma dos quadrados dos desvios entre os dados experimentais de B_R e B_S e os valores obtidos na integração para estas variáveis;
- identifica-se o valor de E que dê o menor valor para a soma dos desvios quadrados. Este valor representa o E para a reação nas condições do experimento.

4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.7.1 Atividade de hidrólise

Foi utilizada a metodologia proposta por Tiss, Carriere e Verger (2001), que se baseia na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis, com NaOH ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) utilizando um titulador automático do tipo pHStat (Metrohm 718 Stat Titrino). Para todos os ensaios, foi preparada uma emulsão com goma arábica 3% (m V^{-1}), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2 mmol L^{-1}), tampão Tris-HCl pH 8,0 ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e NaCl (150 mmol L^{-1}). A esta emulsão foi adicionado o

substrato tributirina, tricaprilina ou trioleína na concentração de 67 mmol L^{-1} . Esta mistura foi homogeneizada durante 15 min em liquidificador. Os preparados enzimáticos – sólido fermentado úmido (600 mg), sólido fermentado seco (150 mg), extrato bruto extracelular (1 mL) ou o extrato liofilizado (500 mg) – foram adicionados em 20 mL de emulsão no próprio frasco de reação, com capacidade de 50 mL e termostatizado, sob agitação magnética (300 rpm), a 50°C , pH 8,0 e seguida por 5 min. Uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de ácidos graxos por minuto, nas condições do ensaio. As análises realizadas por esse método foram feitas em duplicata e os controles com o sólido fermentado esterilizado em autoclave a 120°C durante 15 min.

4.7.2 Atividade de esterificação

A reação de síntese do oleato de etila (FIGURA 18) foi utilizada como reação padrão para a determinação da atividade de esterificação do sólido fermentado seco e do extrato bruto liofilizado. As reações foram realizadas em vials de vidro de 50 mL hermeticamente fechados com tampas de Teflon[®], contendo 5 mL de *n*-heptano, 70 mmol L^{-1} de ácido oleico e 210 mmol L^{-1} de etanol e 500 mg de sólido fermentado seco ou 500 g de extrato bruto liofilizado, a 40°C em agitador orbital a 200 rpm.

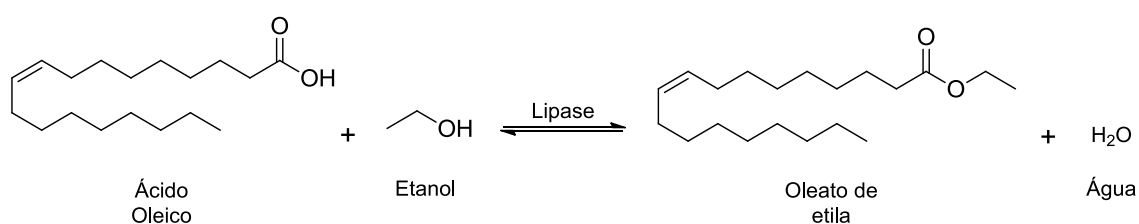


FIGURA 18 – REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

Em intervalos fixos, alíquotas de $100 \text{ } \mu\text{L}$ foram coletadas do meio reacional e analisadas quanto ao teor de ácido graxo residual, através do método de Lowry-Tinsley (item 4.7.3). Para o sólido fermentado, a atividade é expressa como unidades de atividade de esterificação por grama de sólido seco ($\text{U g}^{-1}\text{SS}$). As

reações foram realizadas em triplicata, os controles foram feitos com o sólido fermentado liofilizado esterilizado em autoclave a 120 °C durante 15 min.

4.7.3 Método de Lowry-Tinsley

O método espectrofotométrico de Lowry-Tinsley (1976) foi utilizado para determinar a concentração de ácidos graxos residuais durante as reações de esterificação em presença de solvente orgânico (*n*-heptano). As atividades foram determinadas a partir da cinética de reação, considerando a velocidade inicial de reação. Para cada ensaio, foram adicionados 100 µL da amostra em microtubos (Eppendorfs) de 2 mL, contendo 1,15 mL de tolueno e 250 µL de reativo de cor, que consiste em uma solução aquosa de acetato de cobre II 5% (m V^{-1}), com pH 6,0-6,2, corrigido previamente com piridina. A mistura foi agitada em vórtex durante 40 s e a absorbância da fase orgânica foi lida a 715 nm, em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1800 (Kyoto, Japão). A concentração de ácido graxo no meio foi relacionada à absorbância através de uma curva de calibração feita com o ácido oleico (Sigma, pureza 90%), que foi obtida nas mesmas condições do ensaio. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de consumir 1 µmol de ácido graxo por min nas condições do ensaio; a atividade de esterificação foi expressa em relação à massa seca de sólido fermentado ($\text{U g}^{-1}\text{SS}$) ou à massa de extrato bruto liofilizado (U g^{-1}). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.7.4 Determinação de proteínas

A concentração de proteínas do extrato bruto, liofilizado ou não, foi determinada através do método de Smith *et al.* (1985) ou método do ácido bicinconínico (BCA), utilizando o kit “Pierce BCA Protein Assay” (Pierce Biotechnology, Illinois, EUA) tendo albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

4.7.5 Cromatografia em fase gasosa em coluna quiral

O cromatógrafo a gás utilizado foi o GC-2010 Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com detector de ionização por chama (DIC) e com coluna quiral de fase estacionária de β -ciclodextrina (CP Chirasil-DEX CB), com dimensões de 25 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de diâmetro de filme. As condições cromatográficas de separação para o substrato (*R,S*)-1-fenil-1-etanol foram: injeção (1 μ L) modo split (razão 1:50), temperatura do detector de 220 °C, gás de arraste nitrogênio, N₂, com gradiente de temperatura entre 110 e 120 °C, a 1 °C por min. Para o substrato *p*-nitro-fenil-1-etanol, o gradiente de temperatura foi de 160 até 172 °C, a 1 °C por min. Os valores das conversões foram determinados a partir da integração das áreas dos picos dos álcoois e dos ésteres, de acordo com o item 4.6.8 e 4.6.9.

4.7.6 Cromatografia em fase líquida de alta eficiência em coluna quiral

O cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência (CLAE) utilizado foi o Shimadzu LC-6AD (Kyoto, Japão), equipado com detector UV-Vis em 215 nm e com coluna quiral Phenomenex-Lux de fase estacionária de Cellulose-1 3 μ L, com dimensões de 25 m de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno. As condições cromatográficas, para o substrato (*R,S*)-*p*-metoxi-fenil-1-etanol, foram: injeção de 4 μ L, fase móvel hexano:isopropanol (95:5). Os valores das conversões foram determinados a partir da integração das áreas dos picos dos álcoois e dos ésteres, como descrito no item 4.6.9.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO

Esses ensaios tiveram como objetivo caracterizar a atividade lipolítica do sólido fermentado (SF), antes e depois da liofilização, contra os substratos (naturais) tributirina (C4), tricaprilina (C8) e trioleína (C18:1). O teor de umidade inicial do sólido corresponde a cerca de 80% (m m^{-1}), que após a liofilização diminuiu para 20% (m m^{-1}). A maior atividade hidrolítica foi exibida, tanto pelo SF úmido (SFU) e pelo liofilizado (SFL), quando se utilizou tricaprilina como substrato (310 e 259 $\text{U g}^{-1}\text{SS}$, respectivamente, FIGURA 19). Esse comportamento foi observado no estudo de Botton (2012), onde a maior atividade (264 $\text{U g}^{-1}\text{SS}$) do SFL também foi obtida contra o triacilglicerol de cadeia média (tricaprilina), a 50 °C.

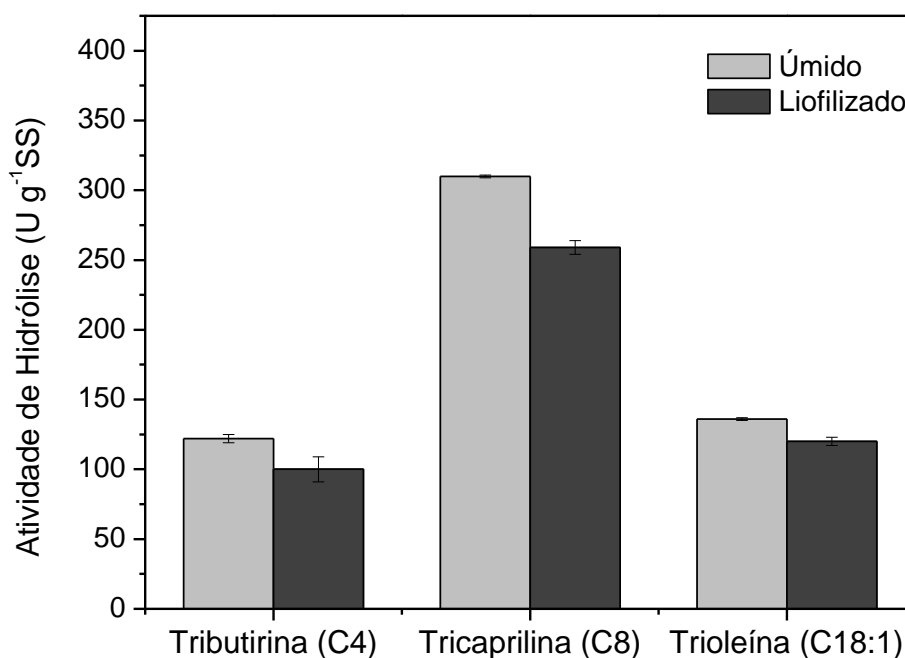


FIGURA 19 – ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DO SÓLIDO FERMENTADO ÚMIDO E LIOFILIZADO PRODUZIDO POR *Rhizopus microsporus*

Condições da reação de hidrólise: método titulométrico pHStat, a 50 °C.

A alta atividade contra a tricaprilina pode ser justificada pela especificidade da enzima ou ainda, pela qualidade de emulsão formada durante o ensaio, pois este triacilglicerol, sendo de cadeia média, é mais solúvel em água do que a trioleína e, portanto, forma emulsões com tamanho de gotículas menor, aumentando a área interfacial de contato entre o substrato e a lipase. Contra a tributirina e a trioleína, a atividade de hidrólise foi similar tanto para o SFU (122 e 136 g⁻¹SS, respectivamente) quanto para o SFL (100 e 120 g⁻¹SS). A atividade das enzimas contidas no SF frente ao substrato de cadeia longa (trioleína), de acordo com Jaeger, Dijkstra e Reerz (1999), torna possível caracterizá-las como lipases “verdadeiras”.

A conversão em éster (FIGURA 20) foi determinada utilizando o SFL, com umidade de 20% (m m⁻¹), para evitar a adição de água ao meio reacional, pois esta poderia deslocar o equilíbrio da reação no sentido da hidrólise.

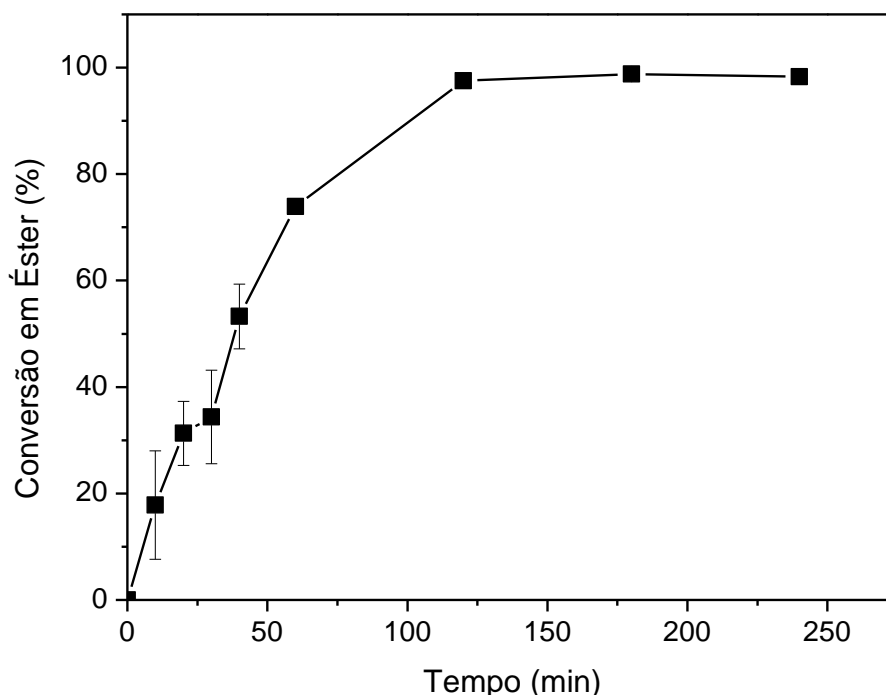


FIGURA 20 – CINÉTICA DA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Rhizopus microsporus*

Condições da reação de esterificação: *n*-heptano 96%, razão molar 1:3 (ácido:álcool), 40 °C, 200 rpm, 100 mg de sólido fermentado por mL de meio (5 mL).

O SFL apresentou conversão em éster de 98% após 2 h e a atividade de esterificação correspondeu a $14 \pm 2 \text{ U g}^{-1}\text{SS}$, o que corrobora os resultados obtidos por Botton (2012).

A estabilidade ao armazenamento, uma propriedade considerada tão importante quanto à estabilidade às condições reacionais, foi avaliada mensalmente através da atividade de hidrólise do SFL armazenado a -18°C (FIGURA 21).

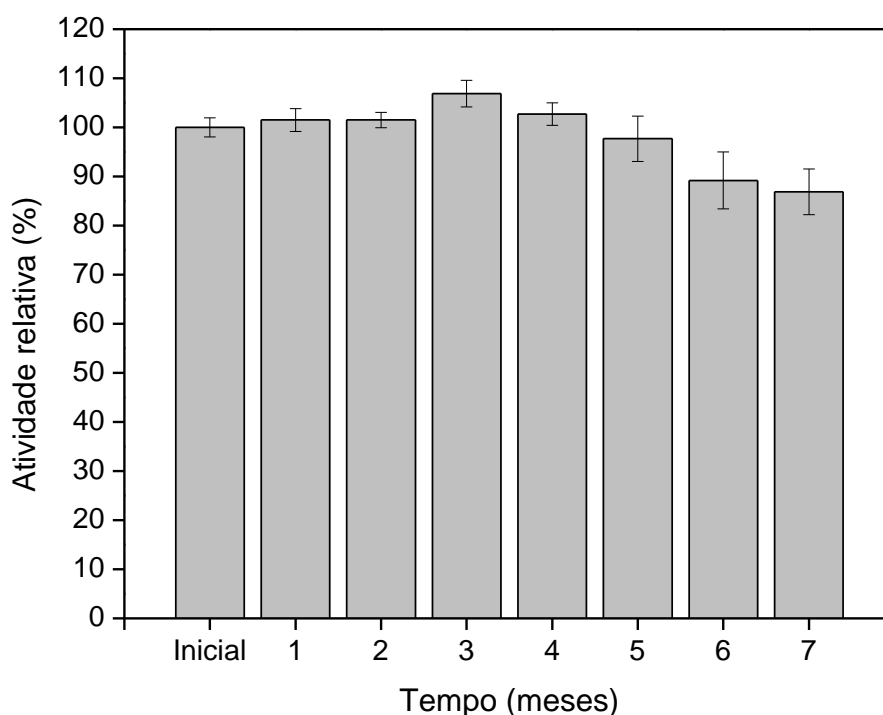


FIGURA 21 – ESTABILIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO DE *Rhizopus microsporus* AO ARMAZENAMENTO

Sólido fermentado liofilizado armazenado a -18°C . Dosagem de atividade realizada em duplicata pelo método titulométrico pHStat com tricaprilina como substrato, a 50°C .

Os resultados mostram que durante os primeiros cinco meses, a atividade relativa média do SFL se manteve acima de 97% e que nos próximos dois meses houve uma queda média de 13% da atividade inicial de $259 \text{ U g}^{-1}\text{SS}$.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO EXTRACELULAR

5.2.1 Efeito das soluções na extração de lipases

Para identificar as enzimas presentes no SF foi necessário preparar um extrato enzimático. Rodriguez *et al.* (2008) argumentam que a extração de enzimas do SF é uma das etapas críticas da FES, pois o processo de FES não envolve água livre e a recuperação das enzimas requer sua extração do SF. Por isso, neste estudo três soluções extratoras foram avaliadas. Na extração realizada com a solução de Tris-HCl com Triton X-100 recuperou-se 120% da atividade (Tabela 2). Esse comportamento também foi observado por Diaz (2005) que, após incubar a lipase de *R. homothallicus* na presença do detergente, obteve 170% da atividade inicial. O autor relaciona essa recuperação maior do que a atividade inicial com uma ativação enzimática decorrente da exposição da lipase ao detergente Triton X-100. Hermoso *et al.* (1996), sugerem que o detergente provoca a abertura da “*lid*” e que a maior exposição do sítio catalítico seria responsável pelo aumento da atividade das lipases.

TABELA 2 – EFEITO DAS SOLUÇÕES EXTRATORAS NA RECUPERAÇÃO DE ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Rhizopus microsporus*

Solução Extratora	Volume (mL)	Atividade Volumétrica ^a (U mL ⁻¹)	Atividade (U totais)	Proteínas ^b (mg mL ⁻¹)	Atividade Específica (U mg ⁻¹)	Recuperação da Atividade ^c (%)
NaCl 2%	40	5	200	0,07	63,7	28
Tris-HCl pH 8,0 e Triton X-100 (0,5%)	40	21	840	0,41	50,7	120
Fosfato pH 7,0	40	8	320	0,34	23,2	45

^aUma unidade de atividade (U): 1 µmol de ácido graxo liberado por min, utilizando tricaprilina como substrato ^bA determinação de proteína foi estimada utilizando o kit Pierce BCA Protein Assay ^cA recuperação de atividade foi calculada pela relação da atividade inicial do sólido fermentado contra a atividade total no extrato bruto.

No entanto, a solução de NaCl 2% foi escolhida para dar continuidade aos ensaios, pois nesta solução obteve-se maior atividade específica. Além disso, o detergente neutro Triton X-100 é considerado um interferente em diversas outras técnicas, o que pode comprometer a utilização do extrato bruto em outras etapas de purificação e caracterização das lipases (FERNANDEZ *et al.*, 1992; TILLER *et al.*, 1984).

Para determinar a atividade de esterificação recuperada após a extração das enzimas do SF, foi necessário liofilizar o extrato bruto extracelular (EBE) e foi possível observar que, após a liofilização, 80% da atividade de hidrólise foi recuperada (Tabela 3). Porém, o extrato liofilizado não apresentou atividade de esterificação. Considerando que o SFL tinha atividade de esterificação de $14 \pm 2 \text{ U g}^{-1} \text{ SS}$, sugere-se que as lipases responsáveis pela catálise das reações de síntese ficaram retidas no SFL, e que possivelmente estas enzimas estão ancoradas à membrana celular, uma vez que não foram removidas pelo processo de extração. Em 2009, Sun e Xu utilizaram o fungo *Rhizopus chinensis* para a produção de lipases e também atribuíram a atividade de síntese às lipases ancoradas à membrana. No entanto, existe a possibilidade da ausência de atividade no extrato liofilizado ter sido ocasionada pela formação de aglomerados de lipases, o que dificultaria a catalise da reação.

TABELA 3 – EFEITO DA LIOFILIZAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DE ATIVIDADE DE HIDRÓLISE E DE ESTERIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO EXTRACELULAR

Solução Extratora	Volume (mL)	Proteínas Recuperadas ^a (%)	Recuperação de Atividade de Hidrólise ^b (%)	Recuperação de Atividade de Esterificação ^c (%)
NaCl 2%	10	57	80	0

^aA recuperação de proteínas foi calculada pela relação da concentração inicial do extrato bruto contra a concentração do extrato bruto liofilizado ^bA recuperação de atividade de hidrólise foi calculada pela relação da atividade inicial do extrato bruto contra a atividade do extrato bruto liofilizado ^cA recuperação de atividade de esterificação foi calculada pela relação da atividade inicial do sólido fermentado contra a atividade do extrato bruto liofilizado.

Apesar de o processo de liofilização ter proporcionado uma recuperação de 80% da atividade de hidrólise do extrato do SF, o extrato bruto líquido foi utilizado na análise por eletroforese SDS-PAGE para dispensar os processos de liofilização e posterior diluição da amostra.

5.2.2 Eletroforese SDS-PAGE e zimograma

O perfil proteico do extrato bruto de *R. microsporus* está mostrado na FIGURA 22. Devido à complexidade do meio de cultivo da fermentação e ao metabolismo fúngico, um número elevado de bandas era esperado, como o obtido por Diaz (2005). Entretanto, as bandas encontradas entre as regiões de 30 e 45 kDa corroboram os resultados do estudo desenvolvido por Diyorov *et al.* (1994), que relataram a presença de duas diferentes isoformas de lipases extracelulares obtidas a partir de extratos de *R. microsporus* UzLT-4B e UzLT-5C. Na primeira cepa, uma das lipases possuía 45 kDa de massa molecular e na outra, foram encontradas lipases de 32 e 43 kDa. Por outro lado, Diaz *et al.* (2006) identificaram lipase extracelular com massa molecular de 29,5 kDa no extrato bruto de FES utilizando *R. homothallicus*.

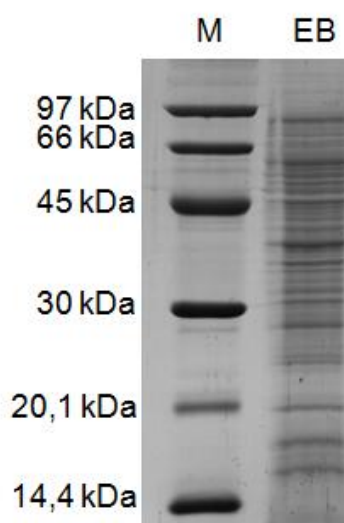


FIGURA 22 – GEL DE ELETROFORESE SDS-PAGE DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO EXTRAÍDO DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Rhizopus microsporus*

Marcadores de massa molecular (M) e perfil proteico do extrato bruto (EB)

Apesar de algumas bandas estarem próximas das massas moleculares descritas na literatura, devido ao grande número de bandas no gel de eletroforese, a presença de lipases foi investigada através de zimograma. No entanto, não houve formação do halo laranja fosforescente, resultado da hidrólise da trioleína e complexação de ácidos graxos com Rhodamina B. Um provável motivo para o não-aparecimento do halo é a inativação das proteínas presentes no gel de eletroforese, presumivelmente causada pela presença do SDS, mesmo após a lavagem com tampão. Dependendo da concentração utilizada, detergentes como o SDS podem causar a inibição de lipases, como observado por Hiol *et al.* (2000) para a lipase de *Rhizopus oryzae* e por Glogauer *et al.* (2011) para a lipase de metagenômica LipC12.

Em análise geral, a provável inativação das proteínas no gel de eletroforese (FIGURA 22), mesmo após lavagem, não permitiu a identificação das bandas correspondentes às lipases extraídas do sólido fermentado.

5.3 ENSAIOS DE ENANTIOSSELETIVIDADE

Para estes ensaios foi utilizado o sólido fermentado liofilizado (SFL) produzido de acordo com o item 4.3, que apresentava atividade de hidrólise de $259 \text{ U g}^{-1}\text{SS}$, de esterificação de $14 \text{ U g}^{-1}\text{SS}$ e teor de umidade de 20% (m m^{-1}). Este sólido foi armazenado a -18°C e foi utilizado durante todo o trabalho.

5.3.1 Efeito do solvente

Diferentes solventes orgânicos foram utilizados como meio de reação para a transesterificação de (*R,S*)-1-fenil-1-etanol com acetato de vinila como doador acila. Os parâmetros de enantiosseletividade foram calculados de acordo Chen *et al.* (1982) e utilizados para avaliar a influência do solvente orgânico na resolução cinética. A FIGURA 23 mostra que o SFL de *Rhizopus microsporus* catalisou a

reação de acilação do (*R,S*)-1-fenil-1-etanol na presença de *n*-heptano e *n*-hexano, mas que o pico correspondente ao éster formado foi ínfimo.

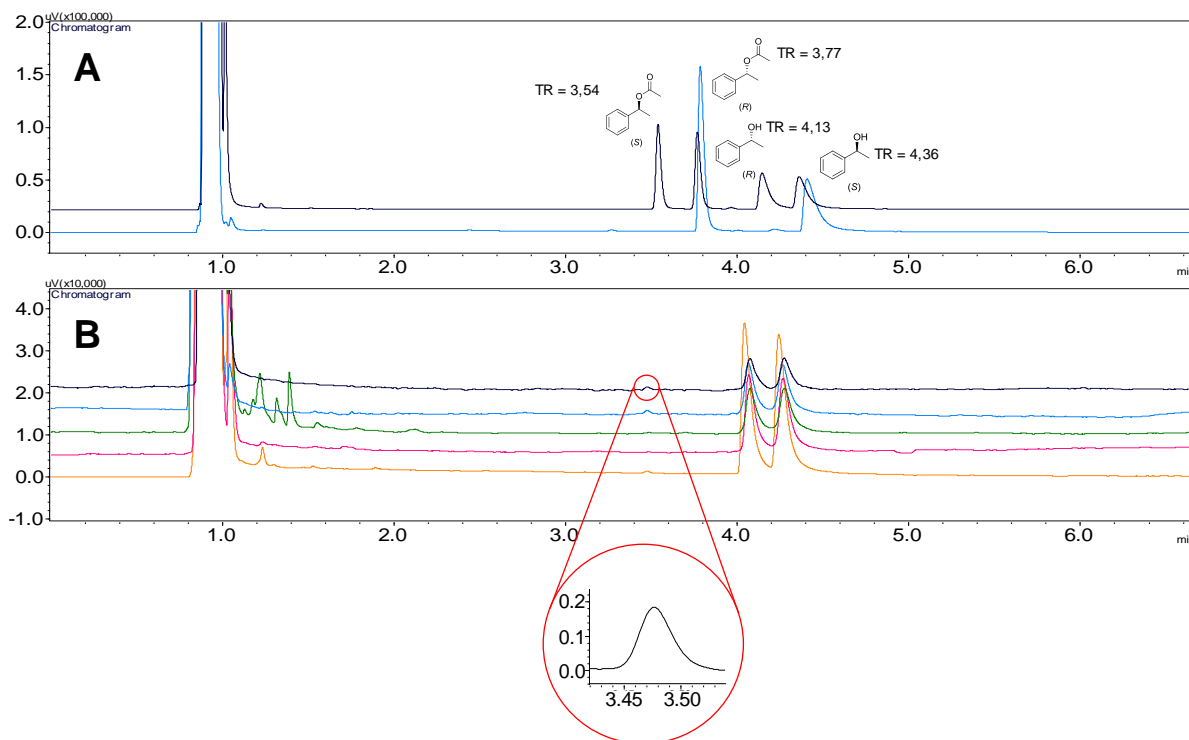


FIGURA 23 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA REAÇÃO DE ACILAÇÃO DE (*R,S*)-1-FENIL-1-ETANOL CATALISADA PELA CALB E POR LIPASES PRESENTES NO SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO EM DIFERENTES SOLVENTES ORGÂNICOS

Em (A) padrão de acetato de 1-fenil-1-etila e 1-fenil-1-etanol (preto) e padrão de enantiosseletividade: reação catalisada pela lipase CALB (azul). Em (B) resolução cinética do (*R,S*)-1-fenil-1-etanol catalisada pelas lipases do sólido fermentado de *Rhizopus microsporus*, na presença de *n*-heptano (preto), *n*-hexano (azul), *tert*-butanol (verde), THF (vermelho) e éter metil-*tert*-butílico (laranja). Coluna quiral (β -ciclodextrina), temperatura do detector de 220 °C, gás de arraste N_2 , temperatura de 110 a 120 °C a 1 °C min⁻¹. Condições reacionais: 0,1 mmol de (*R,S*)-1-fenil-1-etanol, 0,4 mmol de acetato de vinila, 8 mL do solvente orgânico e 150 U, 96 h, a 35 °C.

Apesar da baixa conversão (4%), observou-se um perfil cromatográfico diferente do obtido na reação catalisada pela CALB (FIGURA 23 A), pois para a reação catalisada pelo SF (FIGURA 23 B) os tempos de retenção dos picos sugerem que a preferência das lipases do SF seja para o enantiômero S. Essa relação é possível, pois a CALB possui enantiosseletividade para o isômero *R*, como descrito na literatura por Overmeyer *et al.* (1999) e Almeida *et al.* (1998).

Os parâmetros de conversão (*c*), de excesso enantiomérico do substrato (*ee_s*), do produto (*ee_p*) e razão enantiomérica (*E*) das reações com os diferentes

solventes estão apresentados na Tabela 4. A reação de transesterificação do (*R,S*)-1-fenil-1-etanol catalisada pelo SFL apresentou baixa conversão na presença de *n*-heptano (3,62%) e *n*-hexano (1,81%) em 96 h, sendo que os valores desejáveis estão próximos a 50%.

TABELA 4 – EFEITO DE DIFERENTES SOLVENTES ORGÂNICOS NA RESOLUÇÃO DO (*R,S*)-1-FENIL-1-ETANOL UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO

Mistura racêmica 1-fenil-1-etanol + Acetato de Vinila $\xrightarrow[\text{Solvente Orgânico, 35 °C}]{\text{Lipase}}$ Éster (S)-acetato de 1-fenil-1-etila + Álcool (R)-1-fenil-1-etanol + CH_3CHO

Entrada	Solventes (log <i>P</i>)	Tempo (h)	c ^a (%)	ee ^b (%) Éster	ee ^c (%) Álcool	<i>E</i> ^d	Enantiopreferência
1	THF (0,46)	96	nd	nd	nd	nd	nd
2	Éter metil- <i>terc</i> -butílico (1,43)	96	nd	nd	nd	nd	nd
3	<i>terc</i> -butanol (1,45)	96	nd	nd	nd	nd	nd
4	<i>n</i> -hexano (3,5)	96	1,81	99	2	> 200	S
5	<i>n</i> -heptano (4,0)	96	3,62	99	4	> 200	S

^aConversão em éster ^bExcesso enantiomérico do produto ^cExcesso enantiomérico do substrato ^dRazão enantiomérica.

O valor de ee_p mostra que, do total de substrato convertido, para o solvente *n*-heptano e *n*-hexano, houve um excesso de 99% do enantiômero (*S*). Considerando que, para um composto enantiomericamente puro, o valor de ee deve ser de 1 ou 100%, enquanto que para uma mistura racêmica, esse valor é sempre zero, os valores de excesso enantiomérico e de *E* (>200) são considerados ótimos; porém, podem ser reflexo da baixa conversão observada nos dois casos. No entanto, para os solventes *terc*-butanol, THF e éter metil-*terc*-butílico não houve conversão nas condições do ensaio. Após 96 h, o SFL utilizado nas reações foi recuperado e mantido em dessecador para posterior determinação da atividade de hidrólise e verificou-se que o SF ainda apresentava cerca de 55% da atividade inicial. Essa determinação eliminou a suposição de que a baixa conversão, e a

ausência do produto no caso dos solventes *tert*-butanol, tetraidrofurano e éter metil-*tert*-butilico, estivessem relacionadas à perda da atividade do SFL nas condições do ensaio.

Os resultados do efeito da variação do solvente na resolução cinética do (*R,S*)-1-fenil-1-etanol catalisada pelas lipases presentes no SF são considerados inconclusivos devido à baixa conversão e ao erro inerente à metodologia. Apesar disso, o solvente *n*-heptano foi escolhido para dar continuidade aos experimentos devido à alta estabilidade apresentada pelo SFL na presença desse solvente no estudo realizado por Botton (2012).

5.3.2 Efeito do doador acila

O efeito do doador acila na resolução do (*R,S*)-1-fenil-1-etanol foi investigado pela utilização dos compostos acetato de etila, acetado de vinila ou acetato de isopropenila nas reações de transesterificação. O SFL catalisou a resolução do (*R,S*)-1-fenil-1-etanol na presença de todos os doadores acetato de acila, sendo que o melhor foi o acetato de isopropenila (FIGURA 24).

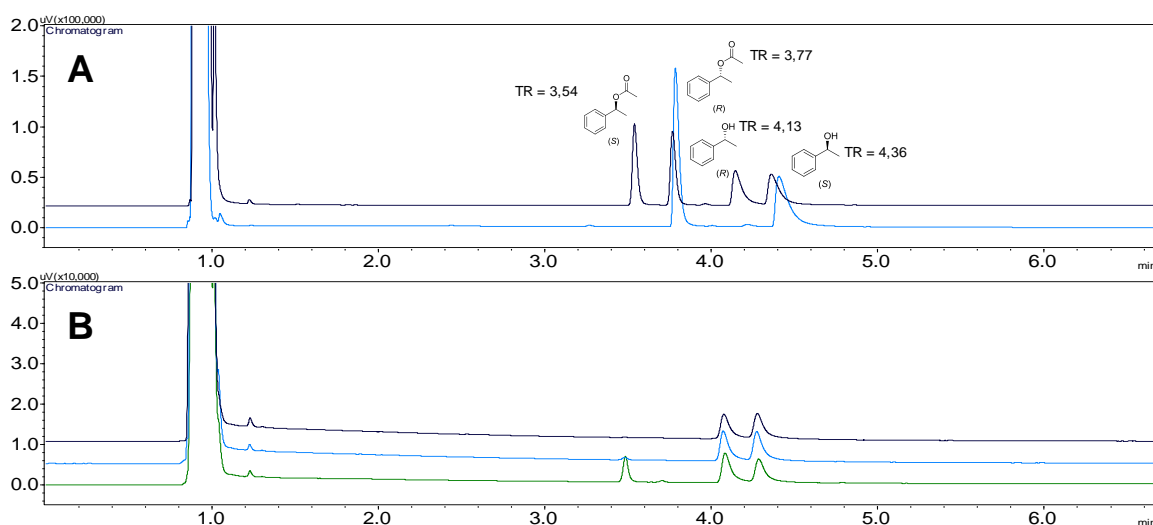


FIGURA 24 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA REAÇÃO DE ACILAÇÃO DE (*R,S*)-1-FENIL-1-ETANOL CATALISADA PELA CALB E POR LIPASES PRESENTES NO SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO NA PRESENÇA DE DIFERENTES DOADORES ACILA

Em (A) padrão de acetato de 1-fenil-1-etila e 1-fenil-1-etanol (preto) e padrão de enantiosseletividade: reação catalisada pela lipase CALB (azul). Em (B) resolução cinética do (*R,S*)-1-fenil-1-etanol catalisada pelas lipases do sólido fermentado de *Rhizopus microsporus*, na presença de acetato de etila (preto), acetato de vinila (azul) e acetato de isopropenila (verde). Coluna quiral (β -ciclodextrina), temperatura do detector de 220 °C, gás de arraste N₂, temperatura de 110 a 120 °C a 1 °C min⁻¹. Condições reacionais: 0,1 mmol de (*R,S*) 1-fenil-1-etanol, 0,4 mmol do doador acila, 8 mL de *n*-heptano e 150 U, 96 h, a 35 °C

Além disso, de acordo com a comparação com o cromatograma da reação catalisada por CALB (FIGURA 24 A), a enantiopreferência das enzimas presentes no SF continuou a ser para o isômero *S*. Os parâmetros de conversão (*c*), de excesso enantiomérico do substrato (*ee_s*), do produto (*ee_p*) e razão enantiomérica (*E*) nas reações com os diferentes doadores acila estão apresentados na Tabela 5. A reação de resolução cinética do (*R,S*)-1-fenil-1-etanol catalisada pelo SFL em 96 h continuou a apresentar baixa conversão na presença de acetato de vinila (3%) com alto excesso enantiomérico do produto (99%). Para o acetato de etila, não houve conversão e para o acetato de isopropenila, a conversão foi de 13%, com *ee_p* de 88% e *E* de 18,4. A enantiosseletividade das enzimas presentes no SF foi mantida para o enantiômero *S*, exceto para as reações utilizando acetato de etila, onde não houve conversão.

TABELA 5 – EFEITO DE DIFERENTES DOADORES ACILA NA RESOLUÇÃO DO ÁLCOOL (*R,S*)-1-FENIL-1-ETANOL UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO

<p>Mistura racêmica 1-fenil-1-etanol + Doador Acila $\xrightarrow[\text{Lipase, } n\text{-heptano, } 35\text{ }^{\circ}\text{C}]{}$ Éster (S) acetato de 1-fenil-1-etila + Álcool (R)-1-fenil-1-etanol + <chem>CC=O</chem></p>							
Entrada	Doadores Acila	Tempo (h)	<i>c</i> ^a (%)	<i>ee</i> ^b (%) Éster	<i>ee</i> ^c (%) Álcool	<i>E</i> ^d	Enantiopreferência
1	Acetato de Vinila	96	3	99	4	> 200	<i>S</i>
2	Acetato de Isopropenila	96	13	88	13	18,4	<i>S</i>
3	Acetato de Etila	96	nd	nd	nd	nd	nd

^aConversão em éster ^bExcesso enantiomérico do produto ^cExcesso enantiomérico do substrato ^dRazão enantiomérica.

A partir dos resultados mostrados na Tabela 5, os doadores acetato de vinila, acetato de etila e acetato de isopropenila também foram testados em sistema livre de solvente (SLS). Pode-se observar que o maior pico de éster foi obtido na reação com acetato de isopropenila e que a enantiopreferência das lipases presentes no SFL não foi alterada (FIGURA 25).

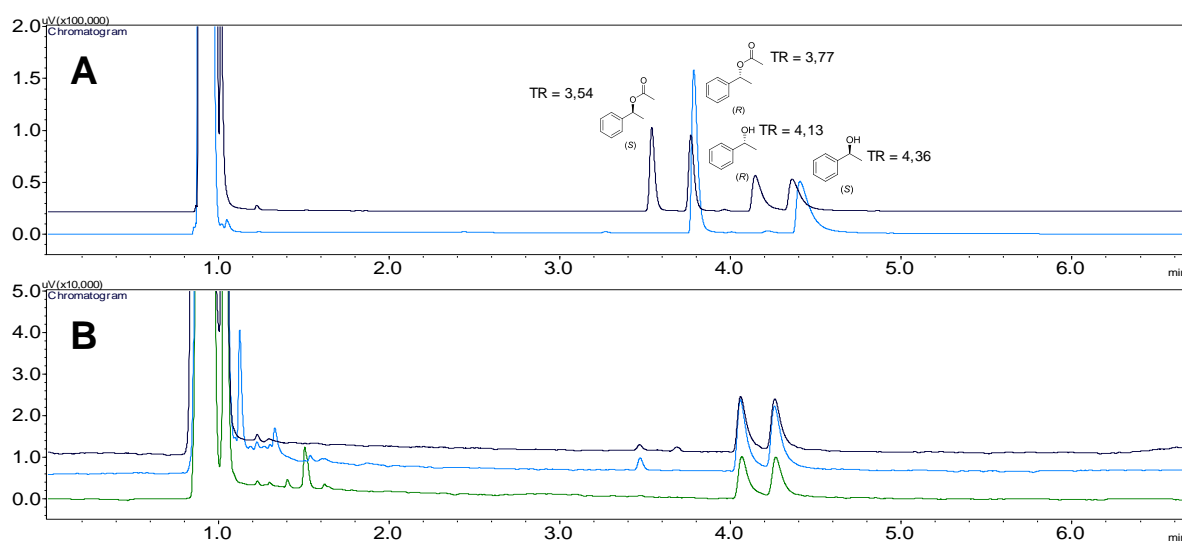


FIGURA 25 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA REAÇÃO DE ACILAÇÃO DE (R,S)-1-FENIL-1-ETANOL CATALISADA PELA CALB E POR LIPASES PRESENTES NO SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE

Em (A) padrão de acetato de 1-fenil-1-etila e 1-fenil-1-etanol (preto) e padrão de enantiosseletividade: reação catalisada pela lipase CALB (azul). Em (B) resolução cinética do (R,S)-1-fenil-1-etanol catalisada pelas lipases do sólido fermentado de *Rhizopus microsporus*, na presença de acetato de vinila (preto), acetato de isopropenila (azul), acetato de etila (verde). Coluna quiral (β -ciclodextrina), temperatura do detector de 220 °C, gás de arraste N_2 , temperatura de 110 a 120 °C a 1 °C min^{-1} . Condições reacionais: 0,1 mmol de (R,S) 1-fenil-1-etanol, 8 mL do doador acila e 150 U, 96 h, a 35 °C.

Em ausência de solvente, a reação utilizando acetato de etila continuou não apresentando conversão em éster, e a conversão utilizando acetato de vinila aumentou cerca de três vezes, mas apresentou um baixo valor de E (1,3) (Tabela 6). A conversão da reação com acetato de isopropenila diminuiu cerca de 4 vezes; porém, o valor de E foi maior que 200. A enantiopreferência das enzimas do SF, para as reações que ocorreram, continuou sendo para o isômero S.

TABELA 6 – EFEITO DE DIFERENTES DOADORES ACILA NA RESOLUÇÃO DO ÁLCOOL (*R,S*)-1-FENIL-1-ETANOL UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE

<p>Mistura racêmica 1-fenil-1-etanol</p> <p>Doador Acila Lipase 35 °C</p> <p>Éster (S) acetato de 1-fenil-1-etila</p> <p>Álcool (R)-1-fenil-1-etanol</p>							
Entrada	Doadores Acila	Tempo (h)	c ^a (%)	ee ^b (%) Éster	ee ^c (%) Álcool	E ^d	Enantiopreferência
1	Acetato de Vinila	96	9	6	1	1,3	S
2	Acetato de Isopropenila	96	3	99	3	> 200	S
3	Acetato de Etila	96	nd	nd	nd	nd	nd

^aConversão em éster ^bExcesso enantiomérico do produto ^cExcesso enantiomérico do substrato
^dRazão enantiomérica.

5.3.3 Efeito da temperatura

Para estudar o efeito da temperatura na resolução do (*R,S*)-1-fenil-1-etanol, foi realizada uma cinética da reação em três temperaturas (35, 40 e 45 °C), nas melhores condições encontradas anteriormente, ou seja, na presença de *n*-heptano e acetato de isopropenila. A maior conversão (20%) foi obtida em 40 °C (FIGURA 26) com um valor de *E* próximo a 15 em 104 h, sendo que para as temperaturas de 35 e 40 °C, o valor de *E* se manteve em 15, e em 45 °C, *E* caiu para cerca de 10. Esse comportamento corrobora a premissa de que altas temperaturas levam a uma menor enantiosseletividade de lipases (DABKOWSKA; SZEWCZYK, 2009; YU *et al.*, 2007; PERSSON *et al.*, 2002; CHEN; TSAI, 2000; PHILLIPS, 1996).

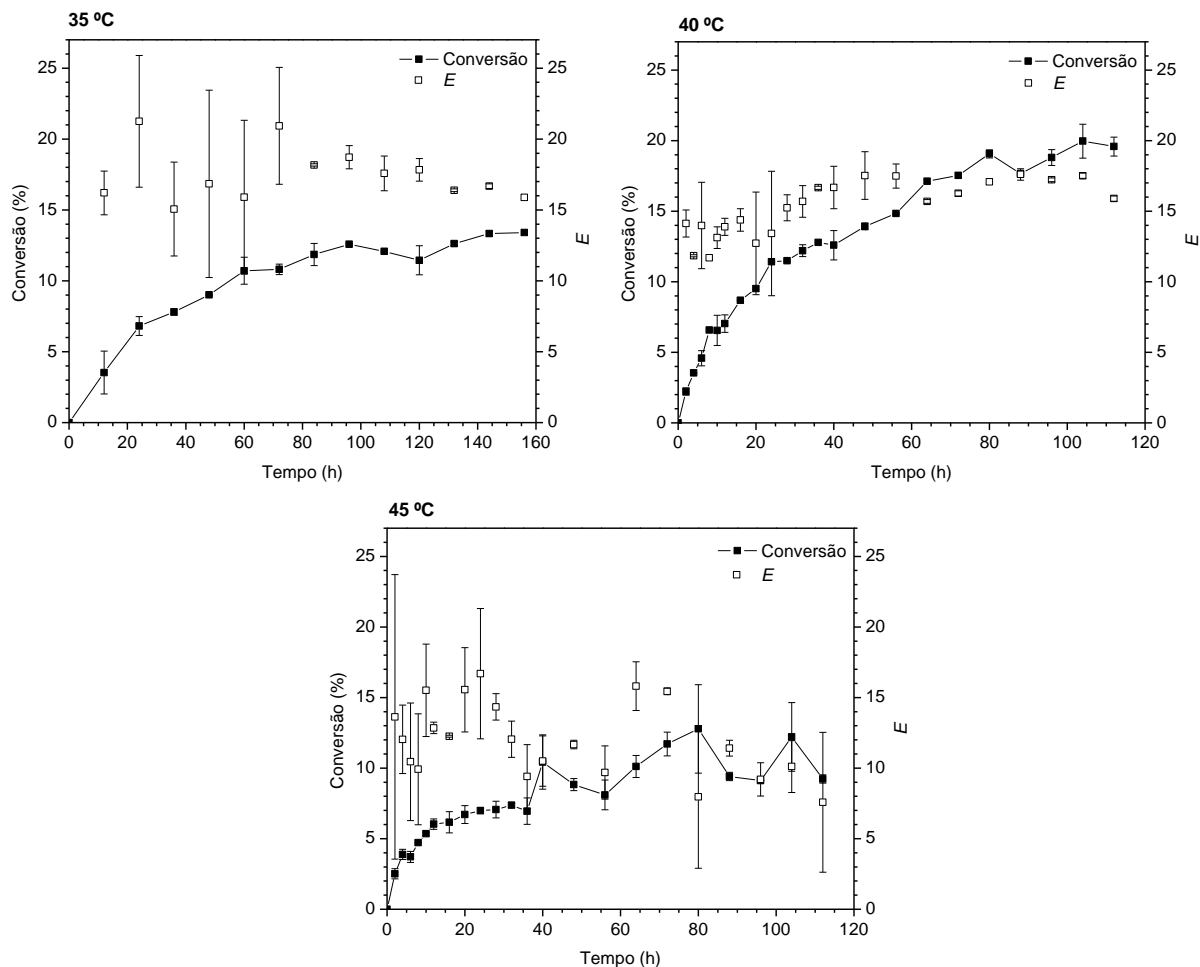


FIGURA 26 - CINÉTICA DA RESOLUÇÃO DE (R,S)-1-FENIL-1-ETANOL EM DIFERENTES TEMPERATURAS UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO

Condições reacionais: 0,1 mmol de (R,S)-1-fenil-1-etanol, 0,4 mmol de acetato de isopropenila, 8 mL de *n*-heptano e 150 U.

O efeito da temperatura também pode ser observado na FIGURA 27, onde as porcentagens relativas de cada enantiômero do 1-fenil-1-etanol e a diferença das porcentagens relativas dos enantiômeros do substrato são maiores para a resolução a 40 °C. Alguns pontos discrepantes durante a cinética podem ser justificados pela forma que as alíquotas foram retiradas das reações, pois cada ponto correspondeu a uma reação individual.

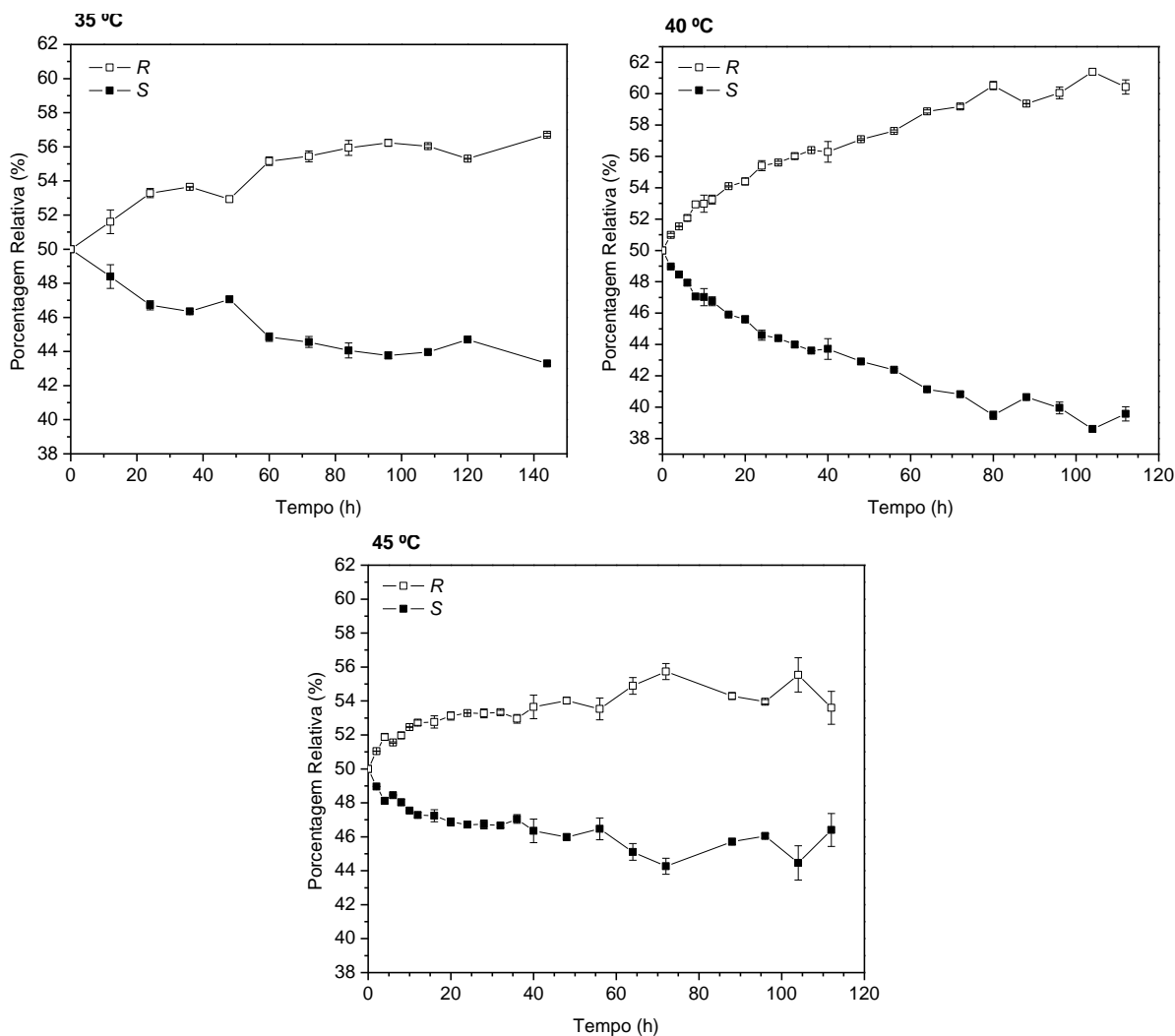


FIGURA 27 – PORCENTAGEM RELATIVA DOS ENANTIÔMEROS *R* E *S* NA RESOLUÇÃO CINÉTICA DE (*R,S*)-1-FENIL-1-ETANOL EM DIFERENTES TEMPERATURAS UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO

Condições reacionais: 0,1 mmol de (*R,S*)-1-fenil-1-etanol, 0,4 mmol de acetato de isopropenila, 8 mL de *n*-heptano e 150 U, a 35 °C, 40 °C e 45 °C.

5.3.4 Efeito da quantidade de atividade enzimática adicionada ao meio reacional

Na tentativa de aumentar a conversão, a reação utilizando o (*R,S*)-1-fenil-1-etanol e acetato de isopropenila como doador acila em presença de *n*-heptano foi repetida aumentando-se a quantidade de unidades enzimáticas adicionadas ao meio de reação. Os resultados mostraram (Tabela 7) que não houve um aumento da conversão, que permaneceu em torno de 20%. Além disso, como era de se esperar,

não houve alteração na razão de enantiomérica (*E*) (STRAATHOF; JONGEJAN, 1997).

TABELA 7 – EFEITO DA QUANTIDADE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA NOS PARÂMETROS DE ENANTIOSELETIVIDADE NA RESOLUÇÃO DO ÁLCOOL (*R,S*)-1-FENIL-1-ETANOL UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO

Atividade Enzimática ^a (U g ⁻¹ SS)	c ^b (%)	<i>E</i> ^c	Enantiopreferência
150	20	15	S
185	19	16	S
460	19	15	S

^aUma unidade de atividade (U): 1 µmol de ácido graxo liberado por min, utilizando tricaprilina como substrato ^bConversão em éster ^cRazão enantiomérica.

5.3.5 Efeito da concentração do substrato

A avaliação do efeito da concentração do substrato na resolução do (*R,S*)-1-fenil-1-etanol foi realizada através da adição de um excesso de 44 vezes do acetato de isopropenila (MOURE *et al.*, 2014), em *n*-heptano e com 150 U, a 40 °C, tendo sido observado um aumento de 18 para 23% na conversão (Tabela 8). A razão enantiomérica (*E*) aumentou de 16 para 26; porém, esse aumento pode ser consequência da grande variação dos valores de *E* calculados pela equação de Chen *et al.* (1982), como observado na FIGURA 25. No entanto, a enantiopreferência continuou sendo para o isômero S, confirmando os resultados anteriores.

TABELA 8 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NOS PARÂMETROS DE ENANTIOSELETIVIDADE NA RESOLUÇÃO DO ÁLCOOL (*R,S*)-1-FENIL-1-ETANOL UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO

<p>Mistura racêmica 1-fenil-1-etanol + Doador Acila $\xrightarrow[\text{Lipase } 40\text{ }^{\circ}\text{C}]{}$ Éster (S) acetato de 1-fenil-1-etila + Álcool (R)-1-fenil-1-etanol + $\text{O}=\text{C}-\text{H}$</p>							
Entrada	Doador Acila	Tempo (h)	c ^a (%)	ee ^b (%) Éster	ee ^c (%) Álcool	E ^d	Enantiopreferência
1	Sem Excesso	96	18	87	21	16	S
2	Com Excesso	96	23	91	27	26	S

^aConversão em éster ^bExcesso enantiomérico do produto ^cExcesso enantiomérico do substrato ^dRazão enantiomérica.


5.3.6 Efeito do tipo de substrato

Para avaliar a influência do volume dos grupos substituintes do anel aromático do álcool na resolução cinética de álcoois catalisada pelo SF, foram testados os álcoois quirais (*R,S*)-*p*-nitro-fenil-1-etanol e (*R,S*)-*p*-metoxi-fenil-1-etanol, e os resultados foram comparados com a resolução do (*R,S*)-1-fenil-1-etanol, utilizado nas reações anteriores. Neste ensaio, manteve-se o excesso de 44 vezes do acetato de isopropenila, a 40 °C com tempo de reação de 96 h.

O maior valor de *E* (27) foi observado na conversão do substrato (*R,S*) 1-fenil-1-etanol (23%), com 91% de ee_s (Tabela 9). Entretanto, maiores conversões, de 50% e 32%, foram observadas para os dois outros álcoois, (*R,S*)-*p*-nitro-fenil-1-etanol e (*R,S*)-*p*-metoxi-fenil-1-etanol, respectivamente, com diminuição dos valores de *E* para 9 e 6. Neste experimento esperava-se que a maior conversão fosse observada para o álcool (*R,S*)- *p*-metoxi-fenil-1-etanol, devido ao grupo metoxi ser um doador de elétrons, conferindo assim uma maior nucleofilicidade para a molécula. Diferentemente do previsto, a maior conversão foi observada para o (*R,S*)-*p*-nitro-fenil-1-etanol, cujo grupo nitro é retirador de elétrons. Dessa forma, é possível pressupor que, além da densidade eletrônica do nucleófilo, outras variáveis estejam envolvidas na enantiosseletividade de lipases. No entanto, em todas as resoluções, foi confirmada a preferência das lipases do SF para o isômero S. Os cromatogramas

referentes às análises da resolução dos álcoois (*R,S*)-1-fenil-1-etanol, (*R,S*)-*p*-nitro-fenil-1-etanol e (*R,S*)-*p*-metoxi-fenil-1-etanol estão disponíveis nos Anexos 1, 2 e 3, respectivamente.

TABELA 9 – EFEITO DO SUBSTRATO NOS PARÂMETROS DE ENANTIOSSELETIVIDADE NA RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO

Mistura racêmica		Acetato de Isopropenila ↓ Lipase 40 °C	Éster (<i>S</i>)	+	Álcool (<i>R</i>)	+	
Entrada	Substratos	Tempo (h)	c ^a (%)	ee ^b (%) Éster	ee ^c (%) Álcool	E ^d	Enantiopreferência
1	(<i>R,S</i>)-1-fenil-1-etanol	96	23	91	27	27	<i>S</i>
2	(<i>R,S</i>)- <i>p</i> -nitro-fenil-1-etanol	96	50	65	62	9	<i>S</i>
3	(<i>R,S</i>)- <i>p</i> -metoxi-fenil-1-etanol	96	32	65	31	6	<i>S</i>

^aConversão em éster ^bExcesso enantiomérico do produto ^cExcesso enantiomérico do substrato

^dRazão enantiomérica.

Devido aos maiores valores de *E* terem sido obtidos na resolução dos álcoois (*R,S*)-1-fenil-1-etanol e (*R,S*)-*p*-nitro-fenil-1-etanol, estas reações foram acompanhadas através de uma cinética da resolução. Para o substrato (*R,S*)-1-fenil-1-etanol, a conversão se manteve em 23% em 96 h e o valor de *E* correspondeu à cerca de 27 (FIGURA 28 A), o que é corroborado pela diferença de 60% entre a porcentagem relativa do substrato *R* e *S* (FIGURA 28 B).

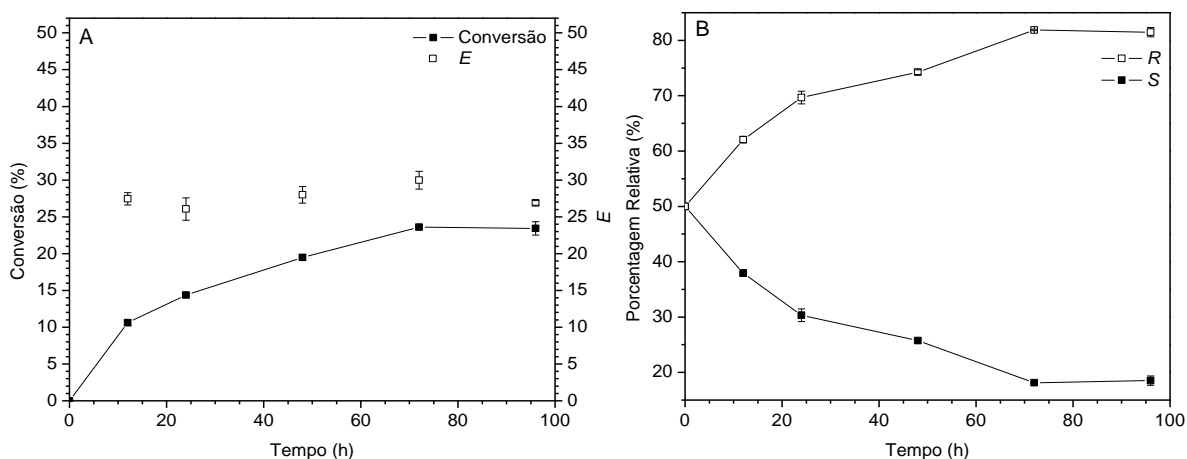


FIGURA 28 – RESOLUÇÃO DE (R,S)-1-FENIL-1-ETANOL E PORCENTAGEM RELATIVA DOS ENANTIÔMEROS R E S

Em (A) os valores de conversão e razão enantiomérica (E) durante a cinética da reação. Em (B) a porcentagem relativa dos enantiômeros R e S do álcool 1-fenil-1-etanol durante a resolução catalisada pelas lipases do sólido fermentado de *Rhizopus microsporus*. Coluna quiral (β -ciclodextrina), temperatura do detector de 220 °C, gás de arraste N_2 , temperatura de 110 a 120 °C a 1 °C min^{-1} . Condições reacionais: 0,1 mmol de (R,S)-1-fenil-1-etanol, 4,4 mmol de acetato de isopropenila, 8 mL de *n*-heptano e 150 U, a 40 °C.

Para o substrato (R,S)-*p*-nitro-fenil-1-etanol, a conversão correspondeu à cerca de 50% em 96 h e o valor de E de aproximadamente 9 (FIGURA 29 A), o que é corroborado pela diferença de 30% entre a porcentagem relativa do substrato R e S (FIGURA 29 B).

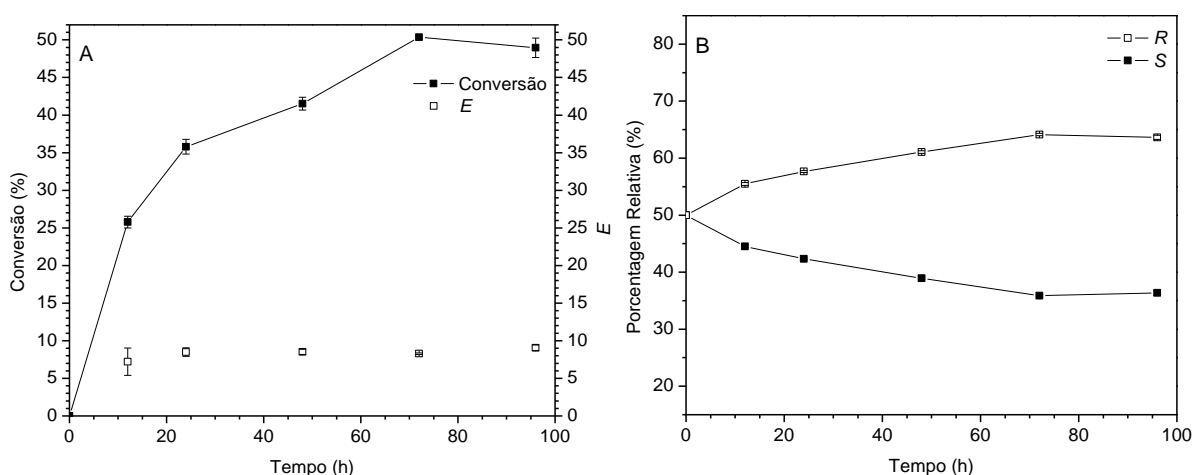


FIGURA 29 – RESOLUÇÃO DE (R,S)-*p*-NITRO-FENIL-1-ETANOL E PORCENTAGEM RELATIVA DOS ENANTIÔMEROS R E S

Em (A) os valores de conversão e razão enantiomérica (E) durante a cinética da reação. Em (B) a porcentagem relativa dos enantiômeros R e S do álcool p -nitro-fenil-1-etanol durante a resolução catalisada pelas lipases do sólido fermentado de *Rhizopus microsporus*. Coluna quiral (β -ciclodextrina), temperatura do detector de 220 °C, gás de arraste N_2 , temperatura de 110 a 120 °C a 1 °C min^{-1} . Condições reacionais: 0,1 mmol de (R,S)-1-fenil-1-etanol, 4,4 mmol de acetato de isopropenila, 8 mL de n -heptano e 150 U, a 40 °C.

Até esta etapa do trabalho, as razões enantioméricas foram calculadas pela equação de Chen *et al.* (1982), página 55, que determina este parâmetro a partir dos excessos enantioméricos obtidos após um único tempo de reação. O cálculo dos valores de E , ao longo do tempo, obtidos pela equação de Chen *et al.* (1982) apresentou grande variação, que pode ser atribuída a pequenas diferenças das áreas do cromatograma, que influenciam diretamente no valor de E e que conferem uma baixa confiabilidade ao método. Devido a este problema, no estudo da influência da temperatura (FIGURA 27) e do efeito do tipo de substrato (FIGURA 28 A e FIGURA 29 A) na enantiosseletividade das lipases presentes no SF, os valores de E também foram determinados através do modelo matemático proposto por Mitchell *et al.* (2010).

Os valores de E calculados através do modelo de Mitchell *et al.* (2010), pelas concentrações normalizadas dos substratos em relação ao grau de reação (G), para os substratos (R,S)-1-fenil-1-etanol e (R,S)- p -nitro-fenil-1-etanol foi de 26 e 8, respectivamente (FIGURA 30). De acordo com o modelo, o valor de E deve permanecer constante durante a cinética das reações, pois se esse valor fosse variável a curva não teria sido ajustada a todos os pontos da cinética.

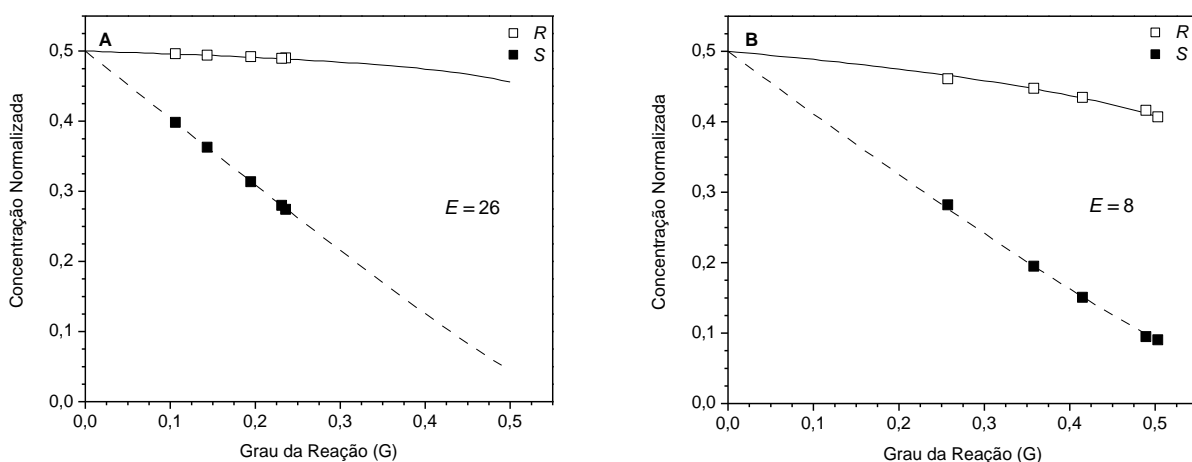


FIGURA 30 – APLICAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO PARA A DETERMINAÇÃO DA RAZÃO ENANTIOMÉRICA NA RESOLUÇÃO DO (R,S) 1-FENIL-1-ETANOL E (R,S)-*p*-NITRO-FENIL-1-ETANOL PELAS LIPASES PRESENTES NO SÓLIDO FERMENTADO

Valores de grau de reação (G) e concentração normalizada para a resolução do álcool (R,S)-1-fenil-1-etanol (A) e (R,S)-*p*-nitro-fenil-1-etanol (B) durante a resolução catalisada pelas lipases do sólido fermentado de *Rhizopus microsporus*. Coluna quiral (β -ciclodextrina), temperatura do detector de 220 °C, gás de arraste N₂, temperatura de 110 a 120 °C a 1 °C min⁻¹. Condições reacionais: 0,1 mmol de (R,S)-1-fenil-1-etanol, 4,4 mmol de acetato de isopropenila, 8 mL de *n*-heptano e 150 U, a 40 °C.

A partir dos valores de E obtidos pelos dois métodos, foi possível concluir que estimar o valor de E com base nos dados de apenas uma amostra coletada em um único tempo de reação é arriscado, devido à falta de representatividade da reação como um todo, como é o caso da determinação pela equação de Chen *et al.* (1982). Dessa forma, o método de Mitchell *et al.* (2010) é uma alternativa mais coerente para determinar o valor de E , uma vez que o modelo calcula E a partir das frações molares, dos substratos e produtos, em relação à conversão de várias amostras ao longo da reação.

Com os resultados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que a otimização da reação de resolução do (R,S)-1-fenil-1-etanol aumentou a conversão de 3% para 23% com E de 26. Embora não tenha sido possível identificar as lipases responsáveis pela atividade de transesterificação, através do perfil cromatográfico obtido na análise das reações foi possível determinar uma enantiopreferência para o isômero S do substrato. Essa característica também foi observada na resolução dos álcoois (R,S)-*p*-nitro-fenil-1-etanol e (R,S)-*p*-metoxi-fenil-1-etanol; esse resultado é particularmente interessante, pois a maioria das lipases descritas na literatura segue a regra de Kazlauskas *et al.* (1991), ou seja, apresenta enantiopreferência pelo

isômero *R*. Ainda que algumas lipases de origem microbiana tenham apresentado enantiopreferência anti-Kazlauskas, elas são bastante incomuns e geralmente apresentam menores valores de *E* e de conversão, quando comparadas às lipases que seguem a regra de Kazlauskas *et al.* (1991).

Os principais trabalhos que relatam lipases fúngicas com enantiopreferência anti-Kazlauskas (Tabela 10) têm como preparado enzimático o SF e acetato de vinila como doador acila (NAGY *et al.*, 2006; SZIGETI *et al.*, 2008). No entanto, algumas lipases imobilizadas também demonstraram enantiopreferência anti-Kazlauskas, com altos valores de conversão e *E*; contudo o alto custo dessas enzimas tem motivado o estudo de preparações enzimáticas mais viáveis economicamente para aplicação em reações de biocatálise.

Os resultados com o SF de *R. microsporus* obtidos neste trabalho, quando comparados aos da literatura, foram satisfatórios (Tabela 10). No entanto, parâmetros que afetam a atividade e enantiosseletividade de lipases, como a atividade de água (a_w) no sistema reacional e o efeito de tratamentos prévios do solvente não foram avaliados e provavelmente poderiam aumentar a conversão da reação de resolução cinética enzimática. Neste contexto, o presente trabalho mostrou que o SF de *R. microsporus* possui potencial na resolução cinética de álcoois secundários e que conhecer as lipases responsáveis pela atividade de transesterificação se torna fundamental para posterior caracterização das suas propriedades estruturais e bioquímicas.

TABELA 10 – REAÇÕES DE RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DE ÁLCOOIS CATALISADA POR LIPASES FÚNGICAS COM ENANTIOREFERÊNCIA ANTI-KAZLAUSKAS

Micro-organismo	Lipase	Substrato	Doador acila	Tempo (h)	c ^a (%)	E ^b	Referência
<i>Mucor hiemalis</i>	Sólido Fermentado ^c	(R,S)-1-ciclo-hexil-etanol	Acetato de vinila	48	4	50	Nagy <i>et al.</i> (2006)
		(R,S)-1-fenil-1-etanol		120	14	15	
		(R,S)-4-fenil-but-3-an-2-ol		192	8	7	Szigeti <i>et al.</i> (2008)
		(R,S)-4-(furan-2-il)but-3-an-2-ol		192	3	7	
<i>Rhizomucor pussilus</i>		(R,S)-4-fenil-but-3-an-2-ol		192	12	7	
		(R,S)-4-(furan-2-yl)but-3-an-2-ol		192	28	5	
<i>Candida antarctica</i>	Imobilizada	(R,S)-5-metil-hex-1-an-3-ol	Propanoato de vinila	8	50	> 150	Chojnacka <i>et al.</i> (2007)
<i>Candida cylindracea</i>		(R,S)-5-metil-hex-1-an-3-ol		8	36	2	
<i>Rhizopus microsporus</i>	Sólido Fermentado ^c	(R,S)-1-fenil-1-etanol	Acetato de isopropenila	96	23	26	Este trabalho (2014)
		(R,S)- <i>p</i> -nitro-fenil-1-etanol		96	50	8	
		(R,S)- <i>p</i> -metoxi-fenil-1-etanol		96	32	6	

^aConversão em éster ^bRazão enantiomérica ^cSólido produzido por fermentação em estado sólido.

6 CONCLUSÕES

O sólido fermentado produzido por *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM apresentou maior atividade de hidrólise (cerca de 300 U g⁻¹SS) quando se usou a tricaprilina como substrato e atividade de esterificação de aproximadamente 14 U g⁻¹SS, sendo estável ao armazenamento, quando mantido a -18 °C. A maior atividade específica de hidrólise (63 U g⁻¹SS) foi obtida na extração de lipases extracelulares contidas no sólido fermentado utilizando uma solução de NaCl 2%; no entanto, após o extrato bruto enzimático liofilizado não apresentou atividade de esterificação. No gel de eletroforese SDS-PAGE, o extrato bruto enzimático apresentou um número elevado de bandas, mas não foi possível identificar as bandas correspondentes às lipases, através de zimograma, devido a uma provável inativação provocada pelo detergente SDS.

Na resolução do (*R,S*)-1-fenil-1-etanol utilizando o sólido fermentado, o melhor doador acila foi o acetato de isopropenila, com conversão de 13% na presença do solvente *n*-heptano. Com relação à temperatura, a maior conversão (20%) foi obtida em 40 °C, com valor de razão enantiomérica próximo a 15 em 104 h. A quantidade de atividade enzimática adicionada ao meio reacional não influenciou na conversão e, como esperado, também não alterou a enantiosseletividade enzimática. O excesso de 44 vezes do acetato de isopropenila, como doador acila, aumentou a conversão de 18 para 23% em 96 h. Com relação ao tipo de substrato, os melhores valores de razão enantiomérica ($E = 27$) foram obtidos na resolução do álcool (*R,S*)-1-fenil-1-etanol, com conversão de 23% em 96 h. Durante a cinética da resolução cinética enzimática dos álcoois (*R,S*)-1-fenil-1-etanol e (*R,S*)-*p*-nitro-fenil-1-etanol o valor de razão enantiomérica, calculado pelo modelo de Mitchell *et al.* (2010), permaneceu constante e correspondeu a 26 e 8, respectivamente.

Em adição aos resultados de otimização, em todas as reações de transesterificação, o perfil cromatográfico obtido indica que as lipases do sólido fermentado liofilizado possuem enantiopreferência anti-Kazlauskas, ou seja, pelo isômero *S* do racemato. Estes resultados sugerem que o sólido fermentado de *Rhizopus microsporus* possui potencial de aplicação em reações de resolução cinética enzimática.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados relatados na utilização do sólido fermentado de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM em reações de resolução cinética enzimática, mostram o potencial da aplicação direta do sólido fermentado em reações de química fina. Portanto, sugerem-se como próximos estudos:

1. Ensaio de caracterização:

- Isolamento e caracterização das diferentes isoformas de lipases contidas no sólido fermentado com relação às suas propriedades bioquímicas e atividades de hidrólise e de síntese.
- Caracterização e comparação das isoformas de lipases produzidas por *Rhizopus microsporus* em fermentação em estado sólido e em fermentação submersa.

2. Ensaio de resolução cinética enzimática:

- Identificação e caracterização das isoformas de lipases responsáveis pela resolução racêmica.
- Determinação da atividade de água (a_w) no sistema reacional e a influência desse parâmetro na enantiosseletividade enzimática e nos valores de conversão.
- Determinação do efeito de tratamentos prévios do solvente na resolução cinética enzimática.
- Estudos de reutilização do sólido fermentado liofilizado de *Rhizopus microsporus* na resolução de álcoois secundários.
- Utilização do sólido fermentado liofilizado de *Rhizopus microsporus* na resolução cinética em reações de hidrólise de ésteres.

REFERÊNCIAS

- ABATE, A.; BRENNA, E.; FUGANTI, C.; GATTI, F.; SERRA, F. Lipase-catalysed preparation of enantiomerically enriched odorants. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 32, p. 33-51, 2004.
- AHMED, M.; KELLY, T.; GHANEMA, A. Applications of enzymatic and non-enzymatic methods to access enantiomerically pure compounds using kinetic resolution and racemisation. **Tetrahedron**, v. 68, p. 6781-6802, 2012.
- AIRES-BARROS, M. R. Biocatálise em solventes Orgânicos. **Boletim de Biotecnologia**, v. 72, p. 2-13, 2002.
- AKAI, S.; NAKA, T.; FUJITA, T.; TAKEBE, Y.; KITA, Y. 1-ethoxyvinyl 2-furoate, na efficient acyl donor for the lipase-catalyzed enantioselective desymmetrization of prochiral 2,2-disubstituted propane-1,3-diols and meso-1,2-diols. **Chemical Communications**, n. 16, p. 1461-1462, 2000.
- ALBERTON, D.; MITCHELL, D. A.; CORDOVA, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; KRIEGER, N. Production of a Fermented Solid Containing Lipases of *Rhizopus microsporus* and Its Application in the Pre-Hydrolysis of a High-Fat Dairy Wastewater. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 28-35, 2010.
- AL-ZUHAIR, S.; LING, F. W.; JUN, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 951-960, 2007.
- ALMEIDA, M. C.; R. RUIVO; C. MAIA; L. S. FREIRE; T. CORRÊA DE SAMPAIO; S. BARREIROS. Novozym 435 Activity in Compressed Gases. Water Activity and Temperature Effects. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 6, p. 494-499, 1998.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392-416, 1996.
- BARON, A. M.; BAROUH; N., BAREA, B.; VILLENEUVE, P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Transesterification of castor oil in a solvent-free medium using the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 immobilized on a hydrophobic support. **Fuel**, v. 117, p. 458-462, 2014.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 175-185, 2012.
- BERGLUND, P. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. **Biomolecular Engineering**, v. 18, p. 13-22, 2001.
- BLASER, H. U.; SPLIDLER, F.; STUDER, M. Enantioselective catalysis in fine chemicals production. **Applied Catalysis A: General**, v. 221, p. 119-143, 2001.

BORNSCHEUER, T. U.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; KRISHNA, H. S. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 433-437, 2002.

BOTTON, V. **Síntese enzimática de monoésteres etílicos (biodiesel) catalisada por sólidos fermentados contendo atividade lipolítica**. Curitiba, 2012, p. 50 (Relatório anual - Doutorado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Paraná.

BOTTON, V.; TODO BOM, M. A.; CARMO, L. C. L.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. **Síntese de ésteres etílicos utilizando a lipase de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM**. In: XIX SIMPOSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, X SIMPOSIO DE HIDROLISE ENZIMATICA DE BIOMASSAS, 2013, Foz do Iguaçu - PR.

CAHN, R. S.; INGOLD, C. K.; PRELOG, V. Specification of Molecular Quirality. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 5, p. 385-415, 1966.

CAO, L.; BORNSCHEUER, U. T.; SCHMID, R. D. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters: Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.6, p. 279-285, 1999.

CAREY, F. **Organic Chemistry**, 2 ed., Mc Graw-Hill: New York, 1992.

CAREY, F.; SUNDBERG, R. **Advanced Organic Chemistry: Structure and Mechanisms**, 5 ed., Springer: Virginia, 2007.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R. Potencial de Biotransformação Enantiosseletiva de Lipases Microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p.614-621, 2005.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de Óleos e Gorduras por Biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.

CHEN, C.; FUJIMOTO, Y.; GIRDAUKAS, G.; SIH, J. Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolution of Enantiomers. **Journal of American Chemistry Society**, v. 104, p. 7294-7299, 1982.

CHEN, J.; TSAI, S. Enantioselective Synthesis of (S)-Ibuprofen Ester Prodrug in Cyclohexane by *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Accurel MP1000. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 986-992, 2000.

CHÊNEVERT, R.; PELCHAT, N.; MORIN, P. Lipase-mediated enantioselective acylation of alcohols with functionalized vinyl esters: acyl donor tolerance and applications. **Tetrahedron: Asymmetry**, n. 20, p. 1191-1196, 2009.

CHOJNACKA, A.; OBARA, R.; WAWRZENCZY, C. Kinetic resolution of racemic secondary aliphatic allylic alcohols in lipase-catalyzed transesterification. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, p 101-107, 2007.

CHUA, L. S.; SARMIDI, M. R. Effect of solvent and initial water content on (*R,S*)-1-phenylethanol resolution. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 3-4, p. 551-556, 2006.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. D. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética e enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 863-873, 1999.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 211-219, 2005.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **Journal of food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2006.

DABKOWSKA, K.; SZEWCZYK, K. W. Influence of temperatura on the activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase in the kinetic resolution of mandelic acid enantiomers. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 147-153, 2009.

DALLY, A. Thalidomide: was the tragedy preventable? **The Lancet**, v. 351, n. 9110, p. 1197-1199, 1998.

DIAZ, J. C. M.; RODRIGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAMD, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothalicus* is more thermostable when produced used solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1042-1050, 2006.

DIAZ, J. C. M. **Nouveaux outils pour la biocatalyse: criblage, purification et caracterisation de lipases issues de champignons thermophiles**. Marseille, 2005, p. 210 (These de Doctorat). Programme de Chimie Moleculaire de Marseille. Université de la Méditerranée.

DIYOROV, J. K.; LUSTA, K. A.; TSIOMENKO, A. B.; KULAEV, I. S. Molecular forms of lipases and their localization in the fungus *Rhizopus microsporus* by immuno-electron microscopy. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 367-373, 1994.

EDLUND, H.; BERGLUND, P.; JENSEN, M.; HEDENSTRÖM, E.; HÖGBERG, H-E. Resolution of 2-methylalkanoic acids. Enantioselective esterification with long chain alcohols catalysed by *Candida rugosa* lipase. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 50, p. 666-671, 1996.

EMA, T.; FUJII, T.; OZAKI, M.; KORENGA, T.; SAKAI, T. Rational control of enantioselectivity of lipase by site-directed mutagenesis based on the mechanism. **Chemical Communications**, p. 4650-4651, 2005.

EMA, T.; MAENO, S.; TAKAYA, Y.; SAKAI, T.; UTAKA, M. Significant effect of acyl groups on enantioselectivity in lipase-catalyzed transesterifications. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 7, n. 3, p. 625-628, 1996.

ERIKSSON, T.; BJORKMAN, S.; ROTH, B.; FYGE, A.; HOGLUND, P. Stereospecific determination, chiral inversion in vitro pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. **Chirality**, v. 7, p. 44-52, 1995.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**, 4 ed. Springer: Berlin, 2000.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalyzed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 263, p. 8-13, 2007.

FERNANDEZ, J.; DEMOTT, M.; ATHERTON, D.; MISCHKE, S. M. Internal protein sequence analysis: enzymatic digestion for less than 10 micrograms of protein bound to polyvinylidene difluoride or nitrocellulose membranes. **Analytical Biochemistry**, v. 201, p. 255-264, 1992.

FITZPATRICK, P.; KLIBANOV, A. How Can the Solvent Affect Enzyme Enantioselectivity? **Journal of American Chemical Society**, v. 113, p. 3166-3171, 1991.

GANJALIKHANY, M. R.; RANJBAR, B.; TAGHAVI, A. H.; MOGHADAM, T. T. Functional Motions of *Candida antarctica* Lipase B: A Survey through Open-Close Conformations. **PloS One**, v. 7, p. 1-11, 2012.

GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R. Solvent-Free Synthesis of Flavour Esters through Immobilized Lipase Mediated Transesterification. **Enzyme Research**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

GHAMGUI, H.; MILED, N.; KARRA-CHAËBOUNI, M.; GARGOURI, Y. Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO₃: A comparative study. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 34-41, 2007.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, p. 1721-1754, 2007.

GHANEM, A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 3331-3351, 2004.

GHANEM, A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Application of Lipases in Kinetic Resolution of Racemates. **Chirality**, v. 17, p. 1-15, 2005.

GHANEM, A.; SCHURIG, V. Lipase-catalyzed access to enantiomerically pure (*R*)- and (*S*)-trans-4-phenyl-3-butene-2-ol. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 57-62, 2003.

GLOGAUER, A.; MARTINI, V. P.; FAORO, H.; COUTO, G. H.; MÜLLER-SANTOS, M.; MONTEIRO, R. A.; MITCHELL, D. A.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; KRIEGER, N. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 54, p. 1-15, 2011.

GONÇALVES, C. C. S.; MARSAIOLI, A. J. Fatos e Tendências da Biocatálise. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1587-1590, 2013.

GOTOR, V. Biocatalysis Applied to the Preparation of Pharmaceuticals. **Organic Process Research & Development**, v. 6, n. 4, p. 420-426, 2002.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p. 111-120, 2006.

HERMOSO, J.; PIGNOL, D.; KERFELEC, B.; CRENON, I.; CHAPUS, C.; FONTECILLA-CAMPS, J. C. Lipase Activation by Nonionic Detergents. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 30, p. 18007-18016, 1996.

HIOL, A.; JONZO, M. D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L. C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 421-430, 2000.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175-186, 2004.

HUDLICKY, T.; REED, J. W. Applications of biotransformations and biocatalysis to complexity generation in organic synthesis. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 3117-3132, 2009.

IFTIKHAR, T.; NIAZ, M.; ALI, E. A.; JABEEN, R.; ABDULLAH, R. Production process of extracellular lipases by *Fusarium* sp. Using agricultural byproducts. **Pakistan Journal of Botany**, v. 44, p. 335-339, 2012.

ILLANES, A. **Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications**, 1 ed., Springer: Virginia, 2008, p. 399.

ILLANES, A.; CAUERHFF, A.; WILSON, L.; CASTRO, G. R. Recent Trends in biocatalysis engineering. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 48-57, 2012.

IWAI, M.; OKUMURA, S.; TSUJISAKA, Y. The comparison of the properties of two lipases from *Penicillium cyclopium* Westring. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 1063-1070, 1975.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JENNESSEN, J.; SCHNURER, J.; OLSSON, J.; SAMSON, R. A.; DIJKSTERHUIS, J. Morphological characteristics of sporangiospores of the temperate fungus *Rhizopus oligosporus* differentiate it from other taxa of the *R. microsporus* group. **Mycological Research**, v. 112, p. 547-563, 2008.

KAMAL, A.; AZHAR, M.; KRISHNAJI, T.; MALIK, S.; AZEEZA, S. Approaches based on enzyme mediated kinetic to dynamic kinetic resolutions: A versatile route for chiral intermediates. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, p. 569-592, 2008.

KAPOOR, M.; GRUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555-569, 2012.

KARRA-CHÂABOUNI, M.; BOUAZIZ, I.; BOUFI, S.; REGO, A. M. B. R.; GARGOURI, Y. Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.66, p.168-177, 2008.

KAZLAUSKAS, R.; WEISSFLOCH, A. N. E.; RAPPAPORT, A. T.; CUCCIA, L. A. A Rule To Predict Which Enantiomer of a Secondary Alcohol Reacts Faster in Reactions Catalyzed by Cholesterol Esterase, Lipase from *Pseudomonas cepacia*, and Lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, p. 2656-2665, 1991.

KILARA, A. Enzyme-modified lipid food ingredients. **Process Biochemistry**, v. 20, n. 2, p. 35-45, 1985.

KIM, H. J.; YOUN, S. H.; SHIN, C. S. Lipase-catalyzed synthesis of sorbitol–fatty acid esters at extremely high substrate concentrations. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 2, p. 174-184, 2006.

KIM, K-W.; SONG, B.; CHOI, M-Y.; KIM, M-J. Biocatalysis in Ionic Liquids: Markedly Enhanced Enantioselectivity of Lipase. **American Chemical Society – Organic Letters**, v. 3, n. 10, p. 1507-1509, 2001.

KISS, V.; EGRI, G.; BÁLINT, J.; LING, I.; BARKÓCZI, J.; FOGASSY, E. Kinetic and chemical resolution of different 1-phenyl-2-propanol derivatives. **Tetrahedron: Asymetry**, v. 17, p. 2220-2234, 2006.

KITPREECHAVANICH, V.; MANEEBOON, T.; KAYANO, Y.; SAKAI, K. Comparative characterization of L-lactic acid-producing thermotolerant *Rhizopus* fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, n. 6, p. 541-546, 2008.

KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**, v. 409, p. 241-246, 2001.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J. C.; BARON, A.; LIMA, V.; MITCHELL, D. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, p. 279-286, 2004.

KRISHNA, S. H. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 3-4, p. 239-267, 2002.

LEE, W.; KIM, K.; KIM, M.; LEE, S. Enzymatic Resolution of Racemic Ibuprofen Esters: Effects of Organic Cosolvents and Temperature. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, p. 613-615, 1995.

LIU, Y.; WANG, F.; TAN, T. Effects of alcohol and solvent on the performance of lipase from *Candida sp.* in enantioselective esterification of racemic ibuprofen. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 2-3, p. 126-130, 2009.

LIU, Y.; LI, C.; MENG, X.; YAN, Y. Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation. **Fuel Processing Technology**, v. 106, p. 303-309, 2013.

LIU, Y.; LI, C.; WANG, S.; CHEN, W. Solid-supported microorganism of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation for biodiesel production: Optimization and Kinetics. **Applied Energy**, v. 113, p. 713-721, 2014.

LIU, Y.; GUO, C.; LIU, C-Z. Development of a mixed solvent system for the efficient resolution of (R,S)-2-octanol catalyzed by magnetite-immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 101, p. 23-27, 2014.

LOWRY, R. R.; TINSLEY, J. I. Rapid colorimetric determination of free acids. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.

MACEDO, G. A.; LOZANO, M. M. S.; PASTORE, G. M. Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus sp.* **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 72-75, 2003.

MADALOZZO, A. D.; MUNIZ, L. S.; BARON, A. M.; PIOVAN, L.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Characterization of an immobilized recombinant lipase from *Rhizopus oryzae*: Synthesis of ethyl-oleate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.12.005> 2013.

MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structure**, 4 ed., John Wiley & Sons: New York, 1992.

MARRIOT, J. B.; MULLER, G.; DALGLEISH, A. G. Thalidomide as an emerging immune-therapeutic agent. **Immunology Today**, v. 20, p. 538-540, 1999.

MARTÍNEZ-RUIZ, A.; GARCÍA, S. H.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; FAVELATORRES, E. Organic phase synthesis of ethyl oleate using lipases produced by solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, n. 2-3, p. 393-401, 2008.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. **The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena**. Springer: New York, p. 13-32, 2006.

MITCHELL, D. A.; MOURE, V. R.; MARQUES, F. A.; KRIEGER, N. A new mathematical method for determining the enantiomeric ratio in lipase-catalyzed reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, n. 1-2, p. 23-28, 2010.

MOHAPATRA, S. C.; HSU, J. T. Optimizing Lipase Activity, Enantioselectivity, and Stability with Medium Engineering and Immobilization for β -Blocker Synthesis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, p. 213-220, 1999.

MOURE, V. R. **Estudo da enantiosseletividade da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB 11 na resolução de álcoois alílicos secundários**. Curitiba, 2009, p.126 (Dissertação de mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica. Universidade Federal do Paraná.

MOURE, V. R.; FABRÍCIO, C.; FRENSCH, G.; MARQUES, F. A.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Enhancing the enantioselectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 towards the resolution of secondary allylic alcohols. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 146-153, 2014.

MOORE, J. C.; BORNSCHEUER, U. T. Biocatalysis and biotransformation: Riding the third wave of biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, 2014.

NAGY, V.; TOKE, E. R.; KEONG, L. C.; SZATZKER, G.; IBRAHIM, D.; OMAR, I. C.; SZAKACS, G.; POPPE, L. Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 141-148, 2006.

OMORI, A.; ASSIS, L. F.; ANDRADE, L. H.; COMASSETO, J. V.; PORTO, A. L. M. Enantiomerically pure organoseleno-1-arylethanol by enzymatic resolution with *Candida antarctica* lipase: Novozym 435. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, p. 1048–1053, 2007.

OVERMEYER, A.; S. SCHRADER-LIPPELT; V. KASCHE; G. BRUNNER. Lipase-catalysed kinetic resolution of racemates at temperatures from 40 °C to 160 °C in supercritical CO₂. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 1, p. 65-69, 1999.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PERSSON, M.; COSTES, D.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 916-923, 2002.

PHILLIPS, R. S. Temperature modulation of the stereochemistry of enzymatic catalysis: prospects for exploitation. **Trends in Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 13-16, 1996.

POGORI, N.; XU, Y.; CHEIKHYOUSSEF, A. Potential aspects of lipases obtained from *Rhizopus* fungi. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, p. 101-116, 2007.

POUDEROYEN, G.; EGGERT, T.; JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, p. 215-226, 2001.

RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 161-179, 2006.

RAIMBAULT, M.; TORO, C. R. **Advances in Solid State Fermentation**, Springer, Dordrecht, pp. 169–181, 1997.

RANI, R.; GHOSH, S. Production of phytase under solid-state fermentation using *Rhizopus oryzae*: Novel strain improvement approach and studies on purification and characterization. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10641-10649, 2011.

RASERA, K.; OSÓRIO, N. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; FERREIRA-DIAS, S. Interesterification of fat blends using a fermented solid with lipolytic activity. **Journal of The American Chemical Society**, v. 76, p. 75-81, 2012.

REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, n. 6, p. 145-150, 2002.

REETZ, M. T. Directed evolution of enantioselective enzymes: an unconventional approach to asymmetric catalysis in organic chemistry. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, p. 5767-5778, 2009.

REETZ, M. T. Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future. **Journal of Organic Chemistry**, v. 135, p. 12480-12496, 2013.

RHEE, J. K.; AHN, D. G.; KIM, Y. G.; OH, J. W. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormonesensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 817-825, 2005.

RODRIGUES, D. S.; CAVALCANTE, G. P.; FERREIRA, A. L. O.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase Type B by Adsorption on Activated Carbon. **Chemical and Biochemical Engineering**, v. 22, n. 1, p. 125–133, 2008.

ROGALSKA, E.; CUDREY, C.; FERRATO, F.; VERGER, R. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. **Chirality**, v. 5, p. 24-30, 1993.

ROGALSKA, E.; NURY, S.; DOUCHET, I.; VERGER, R. Lipase stereoselectivity and regioselectivity toward three isomers of dicaprin: A kinetic study by the monomolecular film technique. **Chirality**, v. 7, n. 7, p. 505-515, 1995.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36-44, 2012.

SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; YAMAMOTO, C. I.; COCCO, L. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1348-1354, 2010.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, p. 531-521, 1958.

SCHRAG, J. D.; LI, Y. G.; CYGLER, M.; LANG, D. M.; BURGDORF, T.; HECHT, H. J.; SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDEL, T. J.; OLIVER, J. D.; STRICKLAND, L. C.; DUNAWAY, C. M.; LARSON, S. B.; DAY, J.; MCPHERSON, A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase, **Structure**, v. 5, n. 2, p. 187-202, 1997.

SILVA, T. B. **Resolução cinética enzimática de álcoois e amins quirais contendo boro e biorredução de cetonas contendo boro**. São Paulo, 2011, p. 173 (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade de São Paulo.

MOURE, V. R. **Estudo da enantiosseletividade da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB 11 na resolução de álcoois alílicos secundários**. Curitiba, 2009, p.126 (Dissertação de mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica. Universidade Federal do Paraná.

SOARES, D.; PINTO, A. F.; GONÇALVES, A. G.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 15-23, 2013.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. Livros Técnicos e Científicos - LTC: Brasil, 2012.

STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 168, p. 1070-1074, 1986.

SUN, S. Y.; XU, Y. Membrane-bound 'synthetic lipase' specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1336-1342, 2009.

SUN, J.; YU, B.; CURRAN, P.; LIU, S. Q. Optimization of flavour ester biosynthesis in an aqueous system of coconut cream and fusel oil catalysed by lipase. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2714-2720, 2012.

SUNNA, A.; HUNTER, L.; HUTTON, C. A.; BERGQUIST, P. L. Biochemical characterization of a recombinant thermoalkalophilic lipase and assessment of its substrate enantioselectivity. **Enzymes and Microbial Technology**, v. 31, n. 4, p. 472-476, 2002.

SZIGETI, M.; TÖKE, E. R.; TURÓCZI, M. C.; NAGY, V.; SZAKÁCS, G.; POPPE, L. Lipase-catalyzed kinetic resolution of 4-aryl- and 4-heteroarylbut-3-en-2-ols. **Archive for Organic Chemistry – ARKIVOC**, n. 3, p. 54-65, 2008.

TEMBA, E. S. C.; OLIVEIRA, I. M. F.; DONNICI, C. L. Álcoois quirais: métodos químicos e catalíticos de obtenção por redução assimétrica. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 112-122, 2003.

TILLER, G. E.; MULLER, T. J.; DOCKER, M. E.; STRUVE, W. G. Hydrogenation of triton x-100 eliminates its fluorescence and ultraviolet light absorption while preserving its detergent properties. **Analytical Biochemistry**, v. 15, p. 262-266, 1984.

TISS, A.; CARRIERE, F.; VERGER, R. Effects of Arabic gum on interfacial lipases binding and activity. **Analytical Biochemistry**, v. 294, n. 1, p. 36-43, 2001.

TUFVESSON, P.; TÖRNVALL, U.; CARVALHO, J.; KARLSSON, A. J.; HATTI-KAUL, R. Towards a cost-effective immobilized lipase for the synthesis of specialty chemicals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 200–205, 2011.

VERGER, R. **Lipases**. Elsevier: Amsterdam, p. 83–150, 1984.

VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 32-38, 1997.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.

WANG, M.; SI, T.; ZHAO, H. Biocatalyst development by directed evolution. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 117–125, 2012.

WARD, O. P.; FANG, J.; LI, Z. Lipase-catalyzed synthesis of a sugar ester containing arachidonic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 1, p. 52–56, 1997.

WNENDT, S.; ZWINGENBERGER, K. Thalidomide's chirality. **Nature**, v. 385, p. 303-304, 1997.

WOOLLEY, P.; PETERSEN, S. B. **Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application**. Cambridge University Press: Cambridge, 1994.

WU, J-Y.; LIANG, M-T. Enhancement of enantioselectivity by altering alcohol concentration in supercritical CO₂. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 32, p. 338-340, 1999.

WU, J-Y; LIU, S-W. Influence of alcohol concentration on lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic naproxen in isooctane: under controlled water activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 2-4, p. 124-130, 2000.

YASUFUKU, Y.; UEJI, S. High temperature-induced high enantioselectivity of lipase for esterification of 2-phenoxypropionic acids in organic solvent. **Bioorganic Chemistry**, v. 25, p. 88-99, 1997.

YAMANE, T. J. Enzyme technology for the lipids industry: an engineering point of view. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 64, n. 12, p. 1657-1662, 1987.

YU, L.; XU, Y.; WANG, X.; YU, X. Highly enantioselective hydrolysis of dl-menthyl acetate to l-menthol by whole-cell lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 47, p. 149–154, 2007.

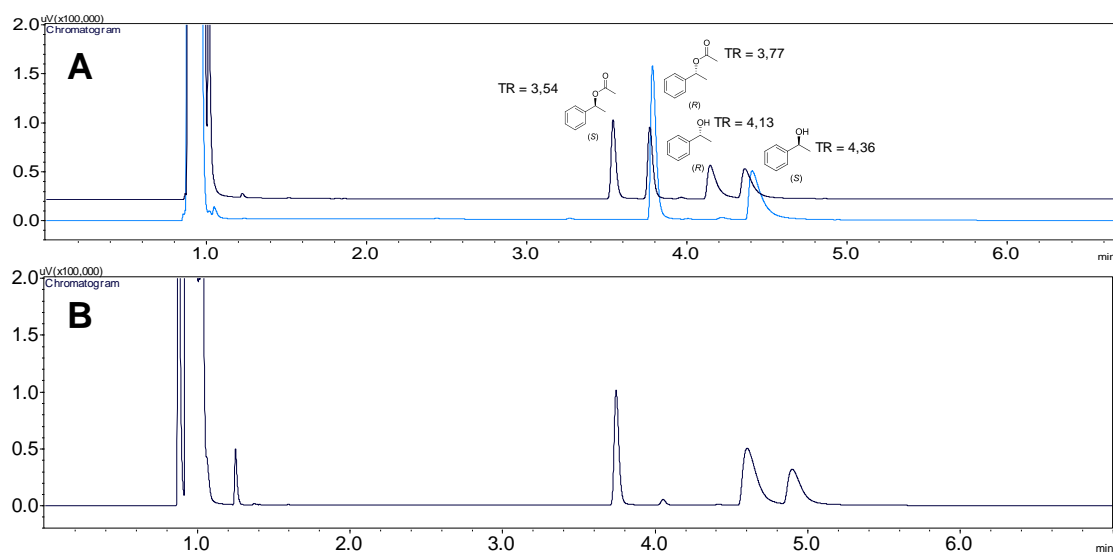
ZAGO, E. **Síntese de ésteres etílicos empregando lipases de *Rhizopus microsporus* produzidas por fermentação no estado sólido**. Curitiba, 2010, p. 127 (Dissertação de mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Paraná.

ZAGO, E.; BOTTON, V.; ALBERTON, D.; CÓRDOVA, J.; YAMAMOTO, C. I.; CÔCCO, L. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Synthesis of Ethylic Esters for Biodiesel Purposes Using Lipases Naturally Immobilized in a Fermented Solid Produced Using *Rhizopus microsporus*. **Energy & Fuels**, 2014 (*in press*).

ZAWADZKI, R. A. F. O.; PRADO, M. R.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Continuous Enzymatic Prehydrolysis Treatment of High-Fat Wastewater. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 2, p. 293-300, 2013.

ANEXO 1

Perfil cromatográfico da resolução cinética do (*R,S*)-1-fenil-1-etanol catalisada pela CALB e por lipases presentes no sólido fermentado liofilizado de *Rhizopus microsporus*.

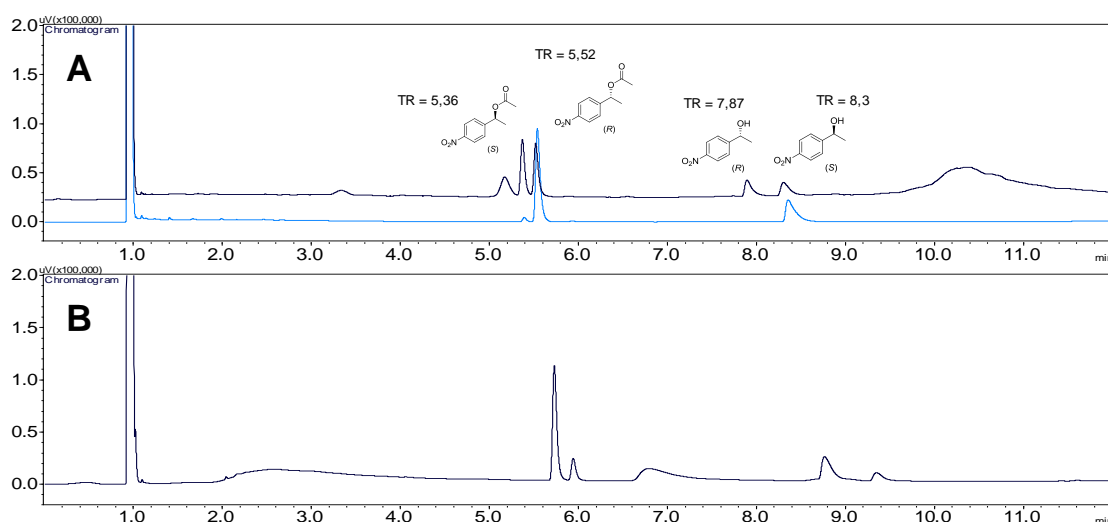


Em (A) padrão de acetato de 1-fenil-1-etila e 1-fenil-1-etanol (preto) e padrão de enantiosseletividade: reação catalisada pela lipase CALB (azul). Em (B) resolução cinética do (*R,S*)-1-fenil-1-etanol catalisada pelas lipases do sólido fermentado de *Rhizopus microsporus*.

Coluna quiral (β -ciclodextrina), temperatura do detector de 220 °C, gás de arraste N_2 , temperatura de 110 a 120 °C a 1 °C min^{-1} . Condições reacionais: 0,1 mmol de (*R,S*)-1-fenil-1-etanol, 4,4 mmol de acetato de isopropenila, 8 mL de *n*-heptano e 150 U, a 40 °C por 96 h.

ANEXO 2

Perfil cromatográfico da resolução cinética do (*R,S*)-*p*-nitro-fenil-1-etanol catalisada pela CALB e por lipases presentes no sólido fermentado liofilizado de *Rhizopus microsporus*.

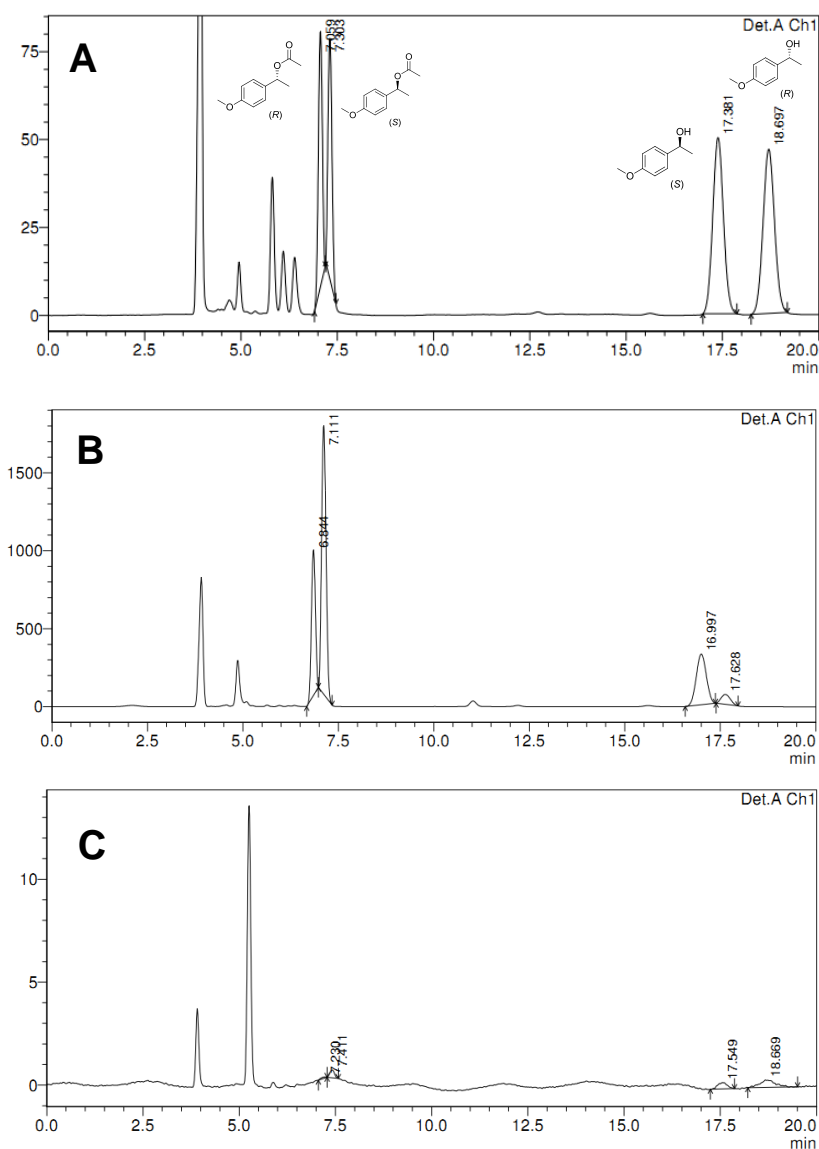


Em (A) padrão de acetato de *p*-nitro-fenil-1-etila e *p*-nitro-fenil-1-etanol (preto) e padrão de enantiosseletividade: reação catalisada pela lipase CALB (azul). Em (B) resolução cinética do (*R,S*)-*p*-nitro-fenil-1-etanol catalisada pelas lipases do sólido fermentado de *Rhizopus microsporus*.

Coluna quiral (β -ciclodextrina), temperatura do detector de 220 °C, gás de arraste N₂, temperatura de 110 a 120 °C a 1 °C min⁻¹. Condições reacionais: 0,1 mmol de (*R,S*)-*p*-nitro-fenil-1-etanol, 4,4 mmol de acetato de isopropenila, 8 mL de *n*-heptano e 150 U, a 40 °C por 96 h.

ANEXO 3

Perfil cromatográfico da resolução cinética do (*R,S*)-*p*-metoxi-fenil-1-etanol catalisada pela CALB e por lipases presentes no sólido fermentado liofilizado de *Rhizopus microsporus*.



Em (A) o padrão de éster e álcool, em (B) a reação catalisada pela enzima comercial CALB e em (C) a resolução utilizando o sólido fermentado liofilizado.

Coluna quiral Phenomenex-Lux (Cellulose), injeção de 4 µL, fase móvel hexano:isopropanol (95:5). Condições reacionais: 0,1 mmol de (*R,S*)-1-fenil-1-etanol, 4,4 mmol de acetato de isopropenila, 8 mL de *n*-heptano e 150 U, a 40 °C por 96 h.